



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI

**KRONİK HEPATİT B'Lİ HASTALAR İLE HEPATİT B'YE
KARŞI SPONTAN BAĞIŞIKLIK KAZANAN KİŞİLER
ARASINDA PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜM GENİ
POLİMORFİZİMLERİNİN SIKLIKLARININ VE
ETKİLERİNİN GÖSTERİLMESİ**

**Dr. Yakup ÜLGER
YANDAL UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr.Macit Ü.SANDIKÇI**

ADANA-2012



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI

**KRONİK HEPATİT B'Lİ HASTALAR İLE HEPATİT B'YE
KARŞI SPONTAN BAĞIŞIKLIK KAZANAN KİŞİLER
ARASINDA PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜM GENİ
POLİMORFİZİMLERİNİN SIKLIKLARININ VE
ETKİLERİNİN GÖSTERİLMESİ**

**Dr. Yakup ÜLGER
YANDAL UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr.Macit Ü.SANDIKÇI**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu Tarafından
TF2011LTP9 no'lu proje olarak desteklenmiştir**

ADANA-2012

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın oluşmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr.Macit Ü. SANDIKÇI, Prof. Dr.Hikmet AKKIZ'a, Doç.Dr. Yüksel GÜMÜRDÜLÜ'ye, Doç.Dr. Sedef KURAN'a, Yrd. Doç.Dr. Oğuz ÜSKÜDAR'a tüm eğitim sürecimde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Gastroenteroloji laboratuvar çalışanları Süleyman BAYRAM, Ersin AKGÖLLÜ, Aynur BEKAR ve Selçuk YILDIRIM'a, gastroenteroloji bilim dalı çalışanlarına ve her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ.....	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
KISALTMA LİSTESİ.....	VII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Hepatit B Epidemiyolojisi	3
2.2.Kronik Hepatit B'nin Tanımı.....	4
2.2.1.Kronik Hepatit B'nin Tanısal Kriterleri.....	4
2.2.2.Kronik HBV Enfeksiyonunun Fazları	5
2.2.3.Okült Hepatit B (OBI)	7
2.2.4.Hepatit B Virüs Enfeksiyonunda Doğal Seyri Etkileyen Faktörler.....	10
2.2.5.HBV İnfeksiyonu Bulaşma Yolları ve Bulaşma Yollarına Göre Risk Grupları	12
2.2.6.Tedavi ve Prognoz	13
2.2.6.1. Kronik Hepatit B Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	17
2.2.7.Hepatit B Virüsün Moleküler Yapısı ve İmmünoloji	19
2.2.8.PD-1 Gen Polimorfizmi	22
2.2.8.1.PD-1-PD-Fonksiyonunun Tolerans ve Otoimmünitedeki Rolü	24
2.2.8.2.İnfeksiyon Hastalıklarında PD-1-PD-L1 Etkileşimleri	25
2.2.8.3.PD-1 Polimorfizmi ve Hastalık İlişkisi	26
2.2.8.4.PD-1 Polimorfizminin HBV ile İlişkisi.....	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	30

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.1.1.2. PD-1 +7146 G → A (PD-1.3) Tek Nükleotid Polimorfizminin Analizinde Kullanılan Primer Çifti.....	30
3.1.1.3. PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizminin Analizinde Kullanılan Primer Çifti.....	31
3.1.1.4. PstI Restriksiyon Endonükleaz	32
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	33
3.1.3. DNA İzolasyonu	33
3.1.3.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	33
3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	33
3.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi	34
3.1.5.1. PCR ve PCR-RFLP Örneklerinin Jele Konması ve Elektroforez.....	35
3.1.6. PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi	35
3.1.6.1. PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizminin Saptamak Amacıyla Bu Polimorfizmin Olabileceği DNA Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....	35
3.1.6.2. PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizmin Bölgesinin PCR İşlemi Sonucunda Görüntülenmesi.....	38
3.1.6.3. PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizmini Belirlemek İçin RFLP Analizi	39
3.1.7. PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi.....	42
3.1.7.1. PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizminin Saptamak Amacıyla Bu Polimorfizmin Olabileceği DNA Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....	42
3.1.7.2. PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizmin Bölgesinin PCR İşlemi Sonucunda Görüntülenmesi	44
3.1.7.3. PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizmini Belirlemek İçin RFLP Analizi	45
3.2. İstatistiksel Analizler	47
4. BULGULAR.....	48

5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	77

TABLO LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo 1. Kronik HBV'nin Farklı Klinik ve Serolojik Göstergeleri	7
Tablo 2. Kronik HBV kılavuz önerileri	16
Tablo 3. PD-1 Genindeki +7146 G → A Polimorfizmini Saptamak İçin Kullanılan Primerlerin Uzunlukları, Erime sıcaklıkları, G/C Oranı ve Baz Dizisi.....	31
Tablo 4. PD-1 Genindeki +7209 C → T Polimorfizmini Saptamak İçin Kullanılan Primerlerin Uzunlukları, Erime Sıcaklıkları, G/C Oranı ve Baz Dizisi	32
Tablo 5. PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizmini Saptamak Amacıyla Optimum Amplifikasyonun Gerçekleştirildiği PCR Reaksiyon Karışımı.....	37
Tablo 6. PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizmini İçin PCR Sıcaklıkları ve Döngü Sayıları ...	37
Tablo 7. PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizmini Belirlemek İçin RFLP Reaksiyonu Karışımı	40
Tablo 8. PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizmini Saptamak Amacıyla Optimum Amplifikasyonun Gerçekleştirildiği PCR Reaksiyon Karışımı.....	43
Tablo 9. PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizmini İçin PCR Sıcaklıkları ve Döngü Sayıları....	43
Tablo 10. PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizminin Belirlenmesi İçin RFLP Reaksiyonu Karışımı.....	46
Tablo 11. Hasta ve Kontrol Grubu Demografik Verileri	49
Tablo 12. Hasta ve Kontrol Grubu Laboratuvar Verileri.....	50
Tablo 13. Kontrol ve Hasta Grubunda PD-1 Geni +7146 G/A (PD-1.3) rs11568821 Polimorfizminin Allel ve Genotiplerin Karşılaştırılması.....	51
Tablo 14. Kronik Hepatit B Grubu ile Spontan HBsAg Klirensli Grubun PD-1 +7209 C/T (rs41386349) Polimorfizminin Allel ve Genotiplerin Karşılaştırılması.....	53
Tablo 15. Kronik Hepatit B Grubu ile Spontan HBsAg Klirensli Grubtaki Kadın ve Erkeklerde PD-1 +7146 G/A (PD-1.3) Polimorfizminin Allel ve Genotip Sıklığının Karşılaştırılması	54
Tablo 16. Kronik Hepatit B grubu ve Spontan HBsAg Klirensli Grubtaki Kadın ve Erkeklerin PD-1 +7209 C/T Polimorfizmi Allel ve Genotip Sıklığı Yönünden Karşılaştırılması	56

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No:

Şekil 1. Dünyada HBV enfeksiyonunun Dağılımı	3
Şekil 2. HBV enfeksiyonunda Doğal Seyir	8
Şekil 3 HBV Progresyonunu Etkileyen Faktörler.....	9
Şekil 4. HBV Temel Yapısı.....	20
Şekil 5. HBV Genomik Yapısı.....	22
Şekil 6. PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizminin Bulunduğu Bölgenin Çoğaltılmasında Kullanılan Primerlerin PD-1 Geni Üzerindeki Konumları ve Polimorfizminin Meydana Geldiği Nükleotid.....	36
Şekil 7. PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizmin Bölgesinin PCR Reaksiyonu İle Çoğaltılması Sonucu Oluşan DNA Parçasının % 2.5’lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü. M: DNA Marker, 1-4: PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizminin Bulunduğu 331 bp’lik DNA Fragmenti 38	
Şekil 8. PstI Restriksiyon Enziminin Tanıma Bölgesi ve PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizmini Neden Olan Nükleotid.....	39
Şekil 9. PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizmini RFLP Yöntemi İle Genotiplendirilmesi Sonucu Oluşan DNA Parçalarının % 2.5’luk Agaroz Jeldeki Görüntüsü. M: DNA marker, 1,3,4: PD-1 +7146 G → A Heterozigot Genotip (331, 276, 55 bp) (GA), 2: PD-1 +7146 G → A A Homozigot Genotip (331 bp) (GG).....	41
Şekil 10. PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizminin Bulunduğu Bölgenin Çoğaltılmasında Kullanılan Primerlerin PD-1 Geni Üzerindeki Konumları ve Polimorfizminin Meydana Geldiği Nükleotid.....	42
Şekil 11. PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizmin Bölgesinin PCR Reaksiyonu İle Çoğaltılması Sonucu Oluşan DNA Parçasının %2.5’lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü. M: DNA Marker, 1-4: PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizminin Bulunduğu 499 bp’lik DNA fragmenti.44	
Şekil 12. BstUI Restriksiyon Enziminin Tanıma Bölgesi ve PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizmini Neden Olan Nükleotid.....	45
Şekil 13. PD-1 +7209 C → T Tek Nükleotid Polimorfizminin RFLP Yöntemi İle Genotiplendirilmesi Sonucu Oluşan DNA Parçalarının %2.5’lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü. M: DNA marker, 1-3 nolu Kuyular PD-1 +7209 Heterozigot CT Genotipli Örnekler (499, 309 ve 190 bp), 4-5 Nolu Kuyular PD-1 +7209 Homozigot CC Genotipli Örnekler (309 ve 190 bp).....	47

KISALTMALAR

AASLD	: American Association for the Study of Liver Diseases
AFP	: Alfa fetö protein
ANOVA	: Varyansların Homojenliđi Testi
APASL	: Asian Pacific Association for the Study of the Liver
Bcl-xl	: B-cell lymphoma-extra large
ccc-DNA	: Kovalent kapalı sirküle deoksiribonükleik asit
CTL	: Sitotoksik T-lenfosit
DC	: Dentritik Hücre
DM	: Diyabet Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleosid Trifosfat
EASL	: European Association For The Study of The Liver
EDTA	: Etilendiamintetra asetik asit
GM-CSF	: Granulate-macrophage colony stimulating factor
HAİ	: Histolojik aktivite indeksi
HbcAg	: Hepatit B core (kor) antijeni
HBeAg	: Hepatit B e antijeni
HBsAg	: Hepatit B surface (yüzey) antijeni
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
HDL	: High-density lipoprotein / Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HIV	: Human Immunodeficiency Virus / İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
HSK	: Hepatocellular carcinoma / Hepatosellüler karsinoma
LCMV	: Congenital Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LDL	: Low-density lipoprotein / Düşük yoğunluklu lipoprotein
MHC	: Major histocompatibility complex / Büyük Doku Uygunluk Kompleksi
MS	: Multipl skleroz

NOD	: Non-obese diabetik / Obez olmayan diyabet
OPR	: Open Reading Frame / Açık okuma alanı
PD-1	: Programlanmış Hücre Ölüm Geni-1
PEG INF	: Pegylated interferon-alpha / Pegile-interferon alfa
PCR	: Polimeraz Chain Reaction / Polimeraz zincir reaksiyonu
RA	: Romatoid artrit
RE	: Restriksiyon endonükleaz
RF	: Romatoid faktör
RFLP	: Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik asit
RUNX1	: Runt-related transcription factor 1 / Runt transkripsiyon faktör
SLE	: Sistemik Lupus Eritromatozus
SNP	: Tek nükleotit polimorfizmi
SHP	: Src homology region 2 domain-containing phosphatase
TCR	: T hücre reseptörü
TKAD	: Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği
TNF	: Tümör nekrozu faktörü
YMDD:	: Tirozin-methionin-aspartat-aspartat motifi

ÖZET

Kronik Hepatit B'li Hastalar ile Hepatit B'ye Karşı Spontan Bağışıklık Kazanan Kişiler Arasında Programlanmış Hücre Ölüm Geni Polimorfizimlerinin Sıklıklarının ve Etkilerinin Gösterilmesi

Giriş ve Amaç: Hepatit B'nin kronikleşmesinde Programlanmış Hücre Ölüm Geninde (PD-1) bulunan G7146A ve T7209C tek nükleotid polimorfizimlerin viral klirens etkisini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve yöntem: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran kronik hepatit B tanısı olan 220 hasta ve kontrol grubu olarak 165 spontan HBsAg klirensli birey çalışmaya alındı. Alınan kan örnekleri PCR-RFLP yöntemi ile çalışıldı.

Bulgular: Kronik hepatit B'li hasta ve spontan HBsAg klirensli kontrol grubunda PD-1 +7146 G → A ve +7209 C → T polimorfizimlerin allel frekansı ve genotipler yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P>0,05$). Ayrıca Protrombin zamanı (PTZ), international normalized ratio (İNR), trombosit ve total kolesterol, trigliserid, LDL, yönünden karşılaştırılan iki grub arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanırken ($p:0,001$), HDL, ALT, AST, GGT, bilirubin, albumin, glukoz, üre, kreatin, lökosit, hemoglobin, hematokrit, ferritin değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P>0,05$).

Sonuç: Türk popülasyonunda PD-1 geni +7146 G → A ve +7209 C → T polimorfizimlerinin hepatit B'nin klirensinde ilişkili olmadığını ileri sürebiliriz, fakat çalışma grubundaki bireylerin sayısının yetersiz olması anlamsız bir ilişkiye neden olmuş olabilir. Bu ilişkinin daha doğru değerlendirilebilmesi için daha fazla sayıda hasta ve kontrol grubu ile çalışma yapılması gerekmektedir. Ayrıca PTZ, İNR, trombosit ve lipid parametrelerinin (HDL hariç) kronik hepatitli hastalarda karaciğerin sentez fonksiyonundaki bozuklukla ilişkili olabileceği düşünülebilir.

Anahtar sözcükler: Kronik Hepatit B, PD-1 polimorfizm, Spontan HBsAg klirensi

ABSTRACT

Demonstration of The Frequencies and Their Effects of Programmed Cell Death (PD) Gene Polymorphisms Between Chronic Hepatitis B Patients and Individuals Who Recovered from Hepatitis B Virus Infection Spontaneously

Introduction and Objective: Programmed cell death-1 (PD-1) plays a critical role in regulating T-cell function during hepatitis B virus (HBV) infection. The present study aims to investigate the relationships between the polymorphism of the PD-1 gene (G7146A and T7209C) and the spontaneous clearance of HBsAg after a HBV infection.

Materials and methods: We used polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay to determine the genotype frequency of two single nucleotide polymorphisms (SNPs) of PD-1 (G7146A and T7209C) in 220 chronic HBV infected patients and 160 control subjects who recovered from HBV infection spontaneously.

Results: No statistically significant differences were found in the allele or genotype distributions of the PD-1 G7146A and T7209C polymorphisms among chronic HBV infected patients and control subjects who recovered from HBV infection spontaneously ($P>0.05$). Also, there were no statistically significant differences in ALT, AST, GGT, bilirubin, albumin, glucose, urea, creatinine, white blood cell, hemoglobin, hematocrit, and ferritin between chronic HBV infected patients and control subjects ($P>0.05$). However, prothrombin time (PT), international normalized ratio (INR), platelets, total cholesterol, triglyceride, LDL and HDL levels were significantly different among chronic HBV infected patients and control subjects ($P=0.001$).

Conclusion: Our results demonstrate that the PD-1 G7146A and T7209C polymorphisms have no major role in genetic susceptibility to spontaneous clearance of HBsAg after a HBV infection, at least in the Turkish population. Independent studies are needed to validate our findings in a larger series, as well as in patients of different ethnic origins. In addition, PTZ, INR, platelets, and lipid parameters in patients with chronic hepatitis may be associated impairment of liver synthesis function.

Key Words: Chronic hepatitis B, PD-1 polymorphisms, Spontaneous HBsAg clearance

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hepatit B enfeksiyonu (HBV) dünyada en yaygın kronik enfeksiyonlardan biri olup 2 milyardan fazla kişi HBV enfeksiyonuna maruz kalmakta ve 350- 400 milyon kronik HBV'li birey bulunmaktadır. HBV akut hepatitten (fulminant hepatite bağlı yetmezlik dahil) kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomaya (HSK) kadar bir dizi karaciğer hastalığına neden olan bir DNA virüsüdür. Her yıl yaklaşık 1 milyon kişi HBV ile ilgili komplikasyonlardan (dekompanse siroz veya HSK) kaybedilmektedir⁽¹⁾.

HBV enfeksiyonun iyileşmesi veya kronikleşmesini belirlemede adaptif immünitinin merkezi bir role sahip olduğu bilinmektedir. Kronik HBV enfeksiyonlu kişilerin periferik kanlarındaki ve karaciğerlerindeki T hücreleri fonksiyonel bozukluğa uğramaktadır. HBV enfeksiyonun immünopatogenezinin anlaşılması, HBV enfeksiyonunun kontrolü ve etkili tedavi stratejilerin geliştirilmesi için çok önemlidir⁽²⁾. T hücreleri ve antijen sunucu hücrelerden eksprese olan pozitif ve negatif kositümulatorler moleküllerin T hücre yanıtında belirleyici olduğu bilinmektedir. Birçok kositümulator molekül arasında programlı hücre ölüm reseptörü 1 (PD-1) ve PD-1 ligandları (PD-L1 ve PD-L2) immün yanıtın düzenlenmesi ve ayarlanmasında önemli bir yolağı oluşturmaktadır. PD-1; 2. kromozomda yer alan (2q37.3) ve 288 aminoasitten oluşan CD28/B7 kostimülatör molekül ailesinin üyesi olup tip 1 transmembran reseptör proteinidir. Virüse spesifik T hücre yanıtını etkileyen PD-1, PD-L1 kositümulator yolağının apoptozun başlatılmasında temel mekanizma olduğu düşünülmektedir. PD-1-PD-L yolağı uyarıcı ve inhibitör sinyalleri arasındaki dengeyi düzenleyerek mikroplara karşı etkili immün yanıtı ve self-toleransın korunmasında rol oynar. PD-1 ve onun ligandları merkezi ve periferik tolerans mekanizmasını etkiler. Bloklanmış PD-1- PD-L1 yolağının inhibitör fonksiyonu, otoimmün hastalıkların gelişmesine katkıda bulunduğu ve bu hastalıkların tedavisinin PD-L1 ekspresyonunu artırarak giderilebileceği düşünülmektedir⁽³⁻⁵⁾.

PD-1-PD-L1 yolağı konağın savunmasında çeşitli etkileşimlerle mikrobiyal patojenlerin eradike edilmesinde ve mikrobiyal stratejilerde immün yanıtı direnç göstermede merkezi bir yoldur. Kronik enfeksiyona sebep olan birçok mikroorganizma

PD-1-PD-L1 yolağını kullanarak immün yanıtı kaçırmaktadır. Birçok çalışmada kronik enfeksiyon süresince PD-1-PD-L1 yolağının immün aracılıklı doku hasarında düzenleyici olduğu sanılmaktadır^(5,6).

Çin'den Feng Lv ve ark. kronik HBV'li hasta grubu ile bu hastaların sağlıklı aile bireylerinden oluşan kontrol grubunda PD-1.1 ve PD-1.2 polimorfizmlerinin sıklığı ve aralarındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Kronik HBV enfeksiyonu ile bu polimorfizmlerin arasında herhangi bir istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır (0,0688)⁽⁷⁾.

İsveç'ten Asad ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada tip 1 diyabetli (Tip 1 DM) hastalarda PD-1 +7146 G/A polimorfizminin diyabetle ilişkisine bakılmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır⁽⁸⁾.

Çin'de Zheng ve ark.nın yaptığı çalışmada kronik hepatit B'li hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında PD-1 allel ve genotip sıklığının HBV viral yük ve kronik enfeksiyon riski ile ilişkisi araştırılmıştır. PD-1 +7209 C **a** T polimorfizminin kronik enfeksiyon riski yönünden allel ve genotip sıklığı ile ilişkili olmadığı fakat düşük viral yük ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Allel ile ilişkisi P:0,009 T/C, Genotip sıklığı ilişkisi P:0,005 TT/CC)⁽⁹⁾.

Bu örneklerde de görüldüğü gibi literatürde PD-1 gen polimorfizmi ile ilgili farklı sonuçlar mevcuttur. Kronik HBV enfeksiyonunda immün klirensin gerçekleşmemesi ile ilişkili bazı olayların rol aldığı düşünüldüğünden, bizde bu çalışmada PD-1 gen polimorfizminin kronikleşmede rol alıp almadığını göstermek için 2009-2011 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi (ÇÜTF) Balcalı Hastanesi Dahiliye Gastroenteroloji polikliniğine başvuran kronik hepatit B'li hasta grubu ile spontan HBsAg klirensli kontrol grubundan oluşan bireylerden alınan kan örneklerinde PCR-RFLP yöntemi ile PD-1 geni üzerinde bulunan tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP) (G7146A ve T7209C) Türk popülasyonunda viral klirens etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonu halen tüm dünyada önde gelen sağlık sorunlarından biri olup yaklaşık 2 milyar kişi virüsle enfektedir. Dünya genelinde 350-400 milyon kişide kronik HBV enfeksiyonu vardır. HBV akut hepatitten (fulminant hepatite bağlı yetmezlik dahil) kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomaya (HSK) kadar bir dizi karaciğer hastalığına neden olan bir DNA virüsüdür. Her yıl yaklaşık 1 milyon kişi HBV ile ilgili komplikasyonlardan (dekompanse siroz veya HSK) kaybedilmektedir.⁽¹⁻²⁾

2.1.Hepatit B Epidemiyolojisi:

HBV enfeksiyonun insidansı ve bulaş yolları dünya genelinde farklılıklar göstermektedir. HBV epidemiyolojik olarak düşük (<%2), orta (%2-7) ve yüksek (>%8) endemisite bölgeleri olmak üzere üç grupta incelenmektedir.



Şekil 1: Dünyada HBV enfeksiyonunun dağılımı

Sahra altı Afrika, Asya'nın büyük bir bölümü ve Batı Pasifik'te %8-10, Amazonlar ve Orta ve Doğu Avrupa'nın güneyinde % 2-7, Hindistan ve Orta Doğu'da

% 5 Avustralya, Yeni Zelanda, Kuzey ve Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da % 2 den az görülmektedir⁽¹⁰⁻¹³⁾

Dünyada yılda beş milyondan fazla akut hepatit B olgusu ortaya çıkmaktadır. Hastalığın karaciğerde yaratacağı hasar kişinin immün cevabına göre değişkenlik gösterir. HBV akut hastalık olarak başlayıp iyileşebilmekte ya da kronikleşebilmektedir. Akut enfeksiyondan sonra yetişkin hastaların % 5'i kronik olarak enfekte kalmaktadır. Akut HBV'de fulminan yetmezlik % 1'den az görülmektedir. Kronik HBV gelişme riski HBeAg pozitif anneden doğan yeni doğanlarda % 90, 5 yaşın altında çocuklarda % 25-30 ve yetişkinlerde % 5 den daha azdır⁽¹⁴⁻¹⁹⁾

Ülkemizde yapılan çalışmalarda hepatit B prevalansının batıdan doğuya doğru gittikçe arttığı, Eskişehir, Antalya, Adana, Elazığ, Sivas ve Erzurum'da yüksek oranlarda bulunduğu, Diyarbakır'da HBsAg pozitiflik oranı % 10'lara ulaştığı bildirilmektedir. Kan donör çalışmalarına göre HBsAg pozitifliği ülkemizde yıllar içinde azalma göstermektedir (% 5,2'den % 2,97'ye). Türk Karaciğer Derneği (TKAD) tarafından yapılan ve 5.471 kişinin tarandığı bir çalışmada HBsAg pozitifliği % 4, anti-HBs pozitifliği % 32, anti-HBc Pozitifliği % 30,6 bulunmuştur. HBsAg pozitif olan hastalarda anti-HBe pozitiflik oranı da % 92,1 olarak saptanmıştır⁽²⁰⁻²²⁾.

2.2.Kronik Hepatit B'nin Tanımı:

HBV varlığının ve karaciğerde nekroinflamatuvar aktivitenin 6 aydan daha fazla devam etmesi kronik hepatit B olarak adlandırılır. HBV DNA'nın anlamlı düzeyde ölçülebilir ($> 10^4$ kopya/ml) olması gereklidir.

2.2.1.Kronik Hepatit B'in Tanısal Kriterleri:

- a)HBsAg pozitif > 6 ay
- b)Serum HBV DNA >20.000 IU/ml (10^5 kopya/ml), 2.000-20.000IU/ml (10^4 - 10^5 kopya / ml gibi, daha düşük değerler sıklıkla HBeAg-negatif kronik hepatit B'li hastalarda görülür.)
- c)Sürekli ya da intermittan transaminaz yüksekliği
- d)Karaciğer biyopsisinde orta veya ileri düzeyde nekroinflamatuvar aktivite, fibrozisin gözlemlendiği kronik hepatit

2.2.2.Kronik HBV Enfeksiyonun Fazları:

Kronik HBV enfeksiyonun doğal seyri virüs-konakçı etkileşimine dayanarak; İmmün tolerans, immün klirens, düşük veya non-replikatif ve reaktivasyon olarak dört fazı içermektedir. HBV doğal seyirinde dört faz olmasına rağmen hastaların tümü bu fazların hepsini yaşamayabilir. Hastanın hangi fazları yaşayacağı veya yaşamayacağı genellikle primer HBV enfeksiyonun edinildiği yaşla ilişkilidir.

İmmün Tolerans Fazı:

Özellikle doğumda ya da erken çocuklukta alınan enfeksiyonda ortaya çıkmaktadır. Nadiren geç çocukluk ve erişkin dönemde de olabilmektedir. Muhtemelen konakçının immün sisteminin olgunlaşmaması nedeniyle yetersiz immün yanıt ya da intrauterin hayatta anneden geçen HBV antijenlerine karşı gelişen immün tolerans nedeniyle HBV ile infekte hepatositlere karşı yeterli immün yanıt gelişmemektedir. HBV alabildiğince replike olmakta, fakat immün yanıt olmadığı için karaciğerde nekroinflamasyon ve fibrosis gelişmemektedir. Bu safhada HBeAg pozitif, HBV DNA düzeyleri çok yüksek ve transaminaz değerleri normaldir. Bu dönemde karaciğer biyopsisi yapılmasına gerek yoktur; ancak yapılırsa normal ya da minimal aktiviteli hepatit gözlenir, aktif hastalık bulgusuna rastlanmaz. Bu dönem genellikle çok düşük spontan HBeAg serokonversiyonu ile birlikte 10-30 yıl sürmektedir.⁽²³⁻²⁹⁾

İmmün Klirens Fazı:

İmmün sistem matür hale geldikçe adölesan dönem veya erişkin yaşlarda HBV antijenine karşı immün aracılıklı hepatosellüler hasar oluşmaya başlar. Bu dönemde transaminaz düzeyleri yüksek (bazen dalgalı aşırı yükselmeler görülebilir), HBeAg pozitif, HBV DNA yüksek ya da dalgalı seyirli ve karaciğer biyopsisinde aktif inflamasyon bulguları mevcuttur.^(30,31). Bu dönemde bazen hastalar asemptomatik olabilirken bazen de semptomatik olup akut hepatiti taklit eden ve fulminan hepatik yetmezliğe gidebilen ataklar ile sonuçlanabilir. HBeAg serokonversiyonu ile birlikte hepatik aktivite remisyona girebilir veya HBV DNA'da geçici azalma ile sonuçlanabilir. Ancak her alevlenme HBeAg serokonversiyonu ve HBV DNA klirensi ile sonuçlanmaz. Bu hastalar intermittant HBV DNA kaybı ile birlikte tekrar tekrar bu durumu yaşayabilirler ve bu da siroz ve HSK gelişim riskini artırır.^(32,33). Bu dönemde

enfeksiyonun alınış yaşına, etnik kökene ve HBV genotipine bağlı olarak değişik oranlarda HBeAg serokonversiyonu meydana gelir.

Bu fazın süresi, alevlenmelerin sıklığı ve şiddeti, siroz ve hepatoselüler kanser (HSK) riskini artırmaktadır. HBeAg serokonversiyonu büyük oranda inaktif HBsAg taşıyıcılığına dönüşmektedir. Az sayıda olguda ise kronik hepatit B'ye dönüşür.^(34,35)

İnaktif Taşıyıcı Fazı;

İmmün klirens döneminin sonunda infekte hücre kitlesi ve virüs replikasyonun azalması ile immün cevabın yatışması sonunda transaminazların normal, virüs replikasyonun çok az, nekroinflamatuvar aktivitenin hafif olduğu bir döneme girilir. İnaktif HBsAg taşıyıcılığında klinik tablo asemptomatiktir. Genellikle ömür boyu sürer ve uzun süreli izlemelerin yapıldığı çalışmalarla prognozun iyi olduğu gösterilmiştir. Özellikle kronik hepatit B seyrinde tablo ne kadar erken dönemde taşıyıcılık formuna dönüşürse, prognozunda o kadar iyi olduğu gösterilmiştir.

İnaktif HBsAg taşıyıcılarının az bir kısmında serum HBsAg klirensi (Düşük prevalansta oran yılda % 1-2, yüksek prevalansta ise oran% 0,05-0,8) olur. Kronik HBV enfeksiyonu taşıyıcılarında diğer popülasyona göre HSK gelişme riski 100 kat fazladır. İnaktif HBsAg taşıyıcılarında HSK gelişme riski % 0,5 civarında bulunmuştur⁽³⁵⁾.

İnaktif HBV Taşıyıcılığı Tanısal Kriterleri:

- 1-HBsAg+ > 6ay veya HBsAg+ / Anti HBc IgM(-)>6ay
- 2-HBeAg(-), anti-HBe(+)
- 3-Serum HBV DNA <2.000 IU/ml(10^4 kopya/ml)
- 4-Sürekli normal transaminaz değerleri
- 5-Yapılırsa karaciğer biyopsisinde normal veya minimal değişiklikler(opsiyonel)

Reaksiyasyon Fazı (HBeAg Negatif Kronik Hepatit B):

Bu fazda HBeAg(-), antiHBe(+), yükselmiş transaminaz düzeyi mecuttur. Düşük serum HBV DNA seviyelerine sahip(<2.000IU/ml) ve normal serum transaminaz düzeyi olan hastalar uygun bir takip olmadıkça inaktif HBsAg taşıyıcısı sınıfına konulmamalıdır. Çünkü HBeAg(-) hastalar geniş transaminaz dalgalanmalarına sahiptir ve başvuruda yaklaşık % 20-30'unda normal transaminaz seviyesine rağmen histolojik

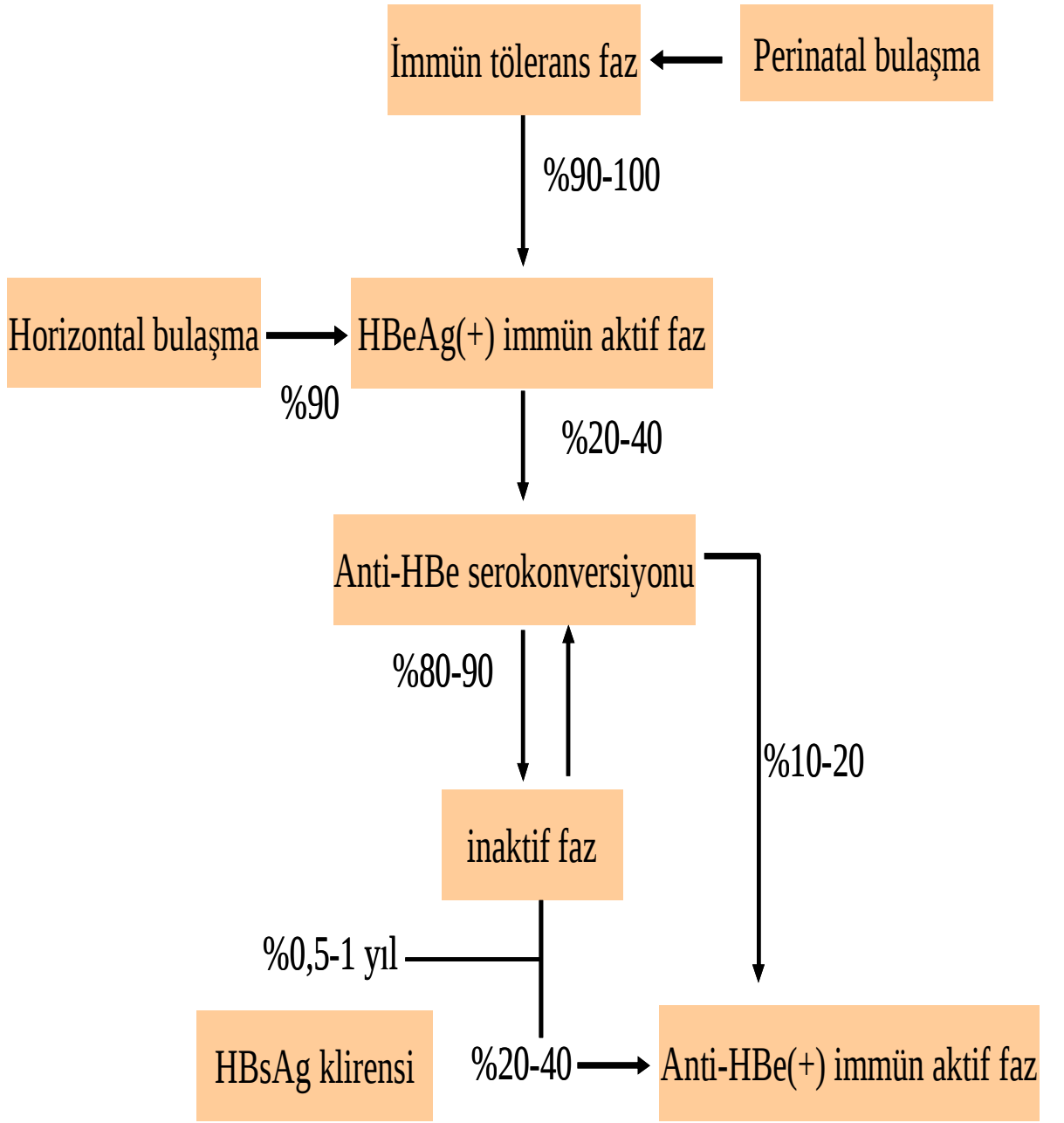
olarak kronik hepatit vardır. Erişkin inaktif HBsAg taşıyıcılarının uzun dönem takibinde % 15-24'ünde HBeAg(-) hepatit geliştiği ve bunlardan % 1-17'sinde HBeAg reversiyonu olduğunu bildirilmektedir^(35,36).

2.2.3.Okült Hepatit B (OBI):

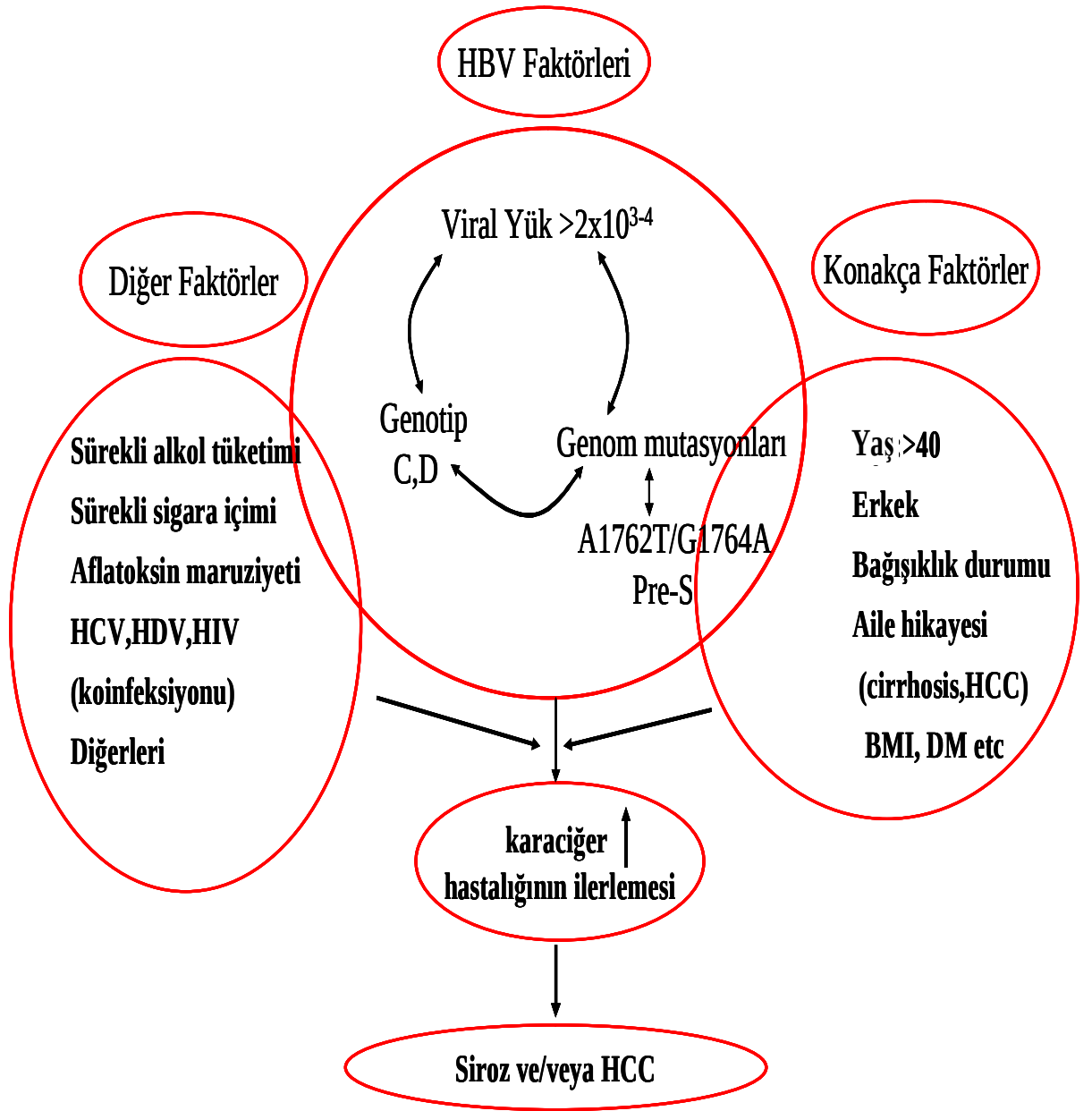
HBsAg negatif bir olguda HBV DNA'nın pozitif bulunmasıdır. Anti HBs ve anti HBc pozitifliği veya sadece anti-HBc pozitifliği görülür⁽³⁶⁾.

Tablo 1: Kronik HBV'nin Farklı Klinik ve Serolojik Göstergeleri⁽³⁶⁾

	HBV DNA	HBsAg	Total antiHBc	Anti-HBs	HBeAg	Anti-Hbe
Kronik HBV	+++	+	+	—	+	—
KronikHBV precore varyant	++	+	+	—	—	+/-
İnaktif taşıyıcı	<10 ² IU/mL	+	+	—	—	+
OBI Seropozitif	<1000IU/mL	—	+	+/-	+/-	+/-
OBI Seronegatif	<1000IU/mL	—	-	-	-	-



Şekil 2: HBV İnfeksiyonunda Doğal Seyir⁽³⁷⁾.



Şekil 3: HBV Progresyonunu Etkileyen Faktörler⁽³⁸⁾

2.2.4.Hepatit B Virüs Enfeksiyonunda Doğal Seyri Etkileyen Faktörler:

Enfeksiyonun Alındığı Yaş;

Kronik HBV enfeksiyonunda doğal seyrin en önemli belirleyicisidir. Neonatal veya erken çocuklukta enfeksiyon daha çok asemptomatik olup yüksek oranda (% 90) kronikleşmektedir. Erişkin dönemde enfeksiyon alındığında ise kronikleşme oranı düşerken, semptomatik olma oranı artmaktadır.

HBV Genotipi;

HBV'nin A'dan H'ya kadar 8 major genotipi vardır. Her bir genotip coğrafi olarak farklı bölgelerde ağırlık kazanmaktadır. Ülkemizde baskın olan genotip D' dir. Pegylated interferon-alfa(PEG-IFN-alfa) ile yapılan bir çalışmada HBVgenotip A ve B'de C ve D'ye göre HBeAg serokonversiyon oranı daha yüksek bulunmuştur. Nükleozid analoglarıyla yapılan çalışmalarda HBV genotipi ile tedavi yanıtı arasında bir ilişki bulunmamıştır.⁽³⁹⁻⁴²⁾

HBeAg /Anti-HBe Antikor Pozitifliği:

Bu husus henüz tam doğrulanmış olmamakla birlikte HBeAg pozitif kronik HBV enfeksiyonu olanlar ve/veya geçikmiş HBeAg serokonversiyonu olanlarda siroz ve HSK gelişme riskinin arttığı bildirilmiştir⁽⁴³⁻⁴⁸⁾.

Hepatik İnflamasyon/Fibrosis/Siroz Durumu;

Hastanın başvurusundaki karaciğer biyopsisinde inflamasyon ve fibrosis durumu siroz riski ile doğrudan ilişkilidir⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾ F3 fibrozisi olan hastalarda siroz riski F1 veya F2'lilere göre dört kat fazladır.

Karaciğer Hastalığının Devamlı Aktif Olması;

Yüksek transaminaz ve HBV DNA seviyeleri, sık alevlenmeler kötü prognoz ile ilişkilidir. HBV replikasyonunda persistan düşüş iyi seyir göstergesidir. Ancak düşük HBV düzeyi hastalık ilerleme riskini tamamen ortadan kaldırmaz⁽⁵²⁻⁵⁴⁾.

Ko-Enfeksiyonlar;

HBV+HDV, HBV+HCV, HBV+HIV ve /veya üçlü enfeksiyonlar siroz ve HSK gelişimini hızlandırır⁽⁵⁵⁻⁶⁴⁾

Metabolik Faktörler;

Diabetes mellituslu (DM) hastalarda siroz ve HSK riskinin artmış olduğu bildirilmiştir. Ayrıca demir yükünün muhtemelen oksidatif stresi artırarak hastalık progresyonunu artırabileceği bildirilmektedir⁽⁶⁵⁻⁷⁰⁾

Karaciğer Yağlanma Durumu;

Kronik HBV enfeksiyonlu hastaların karaciğer biyopsisinde %20-70 steatoz prevelansı bildirilmiştir⁽⁷¹⁻⁷⁴⁾

Non- alkolik yağlı karaciğer metabolik sendrom (obezite, dislipidemi, hipertansiyon, insülin direnci) ile ilişkilidir. Steatozun siroz riskini artırdığı bildirilmektedir.⁽⁷⁵⁾

İleri Yaş;

Başvuruda yaştan ileri olmasının siroz ve HSK insidansını anlamlı derecede artırdığı bildirilmektedir. Bu ise muhtemelen HBV enfeksiyonu ve karaciğer hastalığının daha uzun bir dönemdeki varlığındandır.^(76,77-79)

Erkek Cinsiyet;

Erkek cinsiyet siroz için bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır.

Farklı cinsiyetlerde fibrosis progresyonunu hangi mekanizmaların değiştirdiği bilinmemektedir fakat östrojenin muhtemelen stallet hücreleri inhibe ederek antifibrojenik etki gösterdiği ileri sürülmüştür^(53, 55, 80). Kronik HBV taşıyıcılarında HSK riski erkeklerde kadınlara göre 3-6 kat fazladır^(49, 52).

Alkol Kullanımı;

Bir çalışmada en az 10 yıl boyunca >60gram/gün alkol kullanım olan HBV'li hastalarda yalnızca HBV enfeksiyonu olanlara göre HSK insidansının 2 kat arttığı

bildirilmiştir⁽⁸¹⁾. Ağır alkol tüketiminin siroz riskini 6 HSK riskini ise 3 kat artırdığı bildirilmektedir^(50, 82).

Sigara Kullanımı;

Sigara kullanımı ile ilgili az sayıda ve çelişkili bildirimler mevcuttur. Bir çalışmada sigara içenlerde HSK riski 1,5 kat artırdığı bildirirken⁽⁴⁶⁾, bir başka çalışmada ise ilişki bulunmamıştır.⁽⁵²⁾

Karaciger Kanseri İçin Aile Öyküsü Varlığı;

Ailede HSK olan HBV'lilerde genetik yatkınlığı düşündürür şekilde HSK riski artmaktadır.⁽⁸³⁾

Aflatoksin:

HBV'li hastalarda aflatoksine maruziyet HSK riskini artırmaktadır^(46, 52, 79, 84)

Anjiotensin II Polimorfizmi;

Renin–anjiotensin sisteminin ana peptidi olan anjiotensinin hepatik stellat hücreleri aktive ederek fibrosis yapabildiği ve kronik HBV'li hastalarda anjiotensin geninin promoter bölgesindeki polimorfizmlerin karaciğer sirozu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁽⁸⁵⁾.

2.2.5.HBV İnfeksiyonu Bulaşma Yolları ve Bulaşma Yollarına Göre Risk Grupları

Perkütan (parenteral) Bulaşma;

Çoğul transfüzyon yapılan hastalar

Hemodiyaliz hastaları

Damar içi uyuşturucu bağımlıları

Dövme (tatuaj) yaptıranlar

Sağlık personeli

Cerrahlar

Dışhekimleri

Hemşireler
Hastabakıcılar
Laboratuar teknisyenleri
İlk yardım çalışanları

Cinsel Temasla Bulaşma

Erkek eşcinseller
HBV taşıyıcılarının cinsel partnerleri
Hayat kadınları
Çok partnerli heteroseksüeller

Perinatal Bulaşma

HBV taşıyıcısı annelerin bebekleri

Horizontal Bulaşma

Kalabalık topluluklar halinde kötü hijyen ve düşük sosyo-ekonomik durumda yaşayanlar.
Mental özürlüler

2.2.6.Tedavi ve Prognoz;

Günümüzde mevcut tedaviler HBV'nin eradikasyonunda tam olarak etkili değildir. Hastaya tedavi önerilmeden önce tedaviden beklenen yarar, tedavinin yan etkileri, ilaç direnci, hastanın yaşı, tercihi ve maliyet düşünülmelidir.

Kronik HBV enfeksiyonunda tedavinin hedefleri; HBV eliminasyonu veya viral süpresyon; HBeAg serokonversiyonu, HBV DNA negatifleşmesi, HBsAg kaybı, transaminazların normal değerlere inmesi, karaciğerde nekroinflamatuvar aktivitede azalma, hastalığın dekompanse tabloya dönüşmesini, siroz veya HSK gelişmesini engellemektir. Ancak HBV enfeksiyonunda en kalıcı ve en güvenli prognoz göstergesi HBsAg kaybı ve anti- HBs gelişimidir.

Kronik HBV'nin tedaviye yanıtının değerlendirilmesinde;

Biyokimyasal Yanıt;

Transaminazların normal değerlere düşmesidir.

Virolojik Yanıt;

HBV DNA'nın saptanamayacak düzeye inmesi ($<10^5$ kopya/ml), HBeAg pozitif olanlarda antijen kaybıdır.

Histolojik Yanıt;

Başlangıçtaki karaciğer biyopsisine kıyasla histolojik aktivitenin en az 2 puan azalmasıdır.

Tam Yanıt;

Biyokimyasal ve virolojik yanıtın yanı sıra HBsAg kaybıdır.

Kronik HBV tedavisinde HBV DNA'da en az $2 \log_{10}$ IU/ml kadar bir düşme ya da 20.000 IU/ml'nin altına inmesine “kısmi yanıt”, HBV DNA 24. haftada $2 \log_{10}$ 'dan fazla düşmüyorsa buna “primer cevapsızlık”, tedavi süresi içinde HBV DNA'nın $1 \log_{10}$ 'dan fazla yükselmesi ise “virolojik breakthrough” olarak adlandırılmaktadır.

Kronik hepatit hastasına hangi aşamada tedavi verileceği önem taşır. Transaminazları normal, immün tolerans ya da inaktif taşıyıcı fazında olan kişiler tedavi adayı değildir.

Kronik hepatit B ile ilgili tedavi klavuzlarının önerilerine göre; Kronik HBV'li HSK için yüksek riskli 40 yaşın üstü Asyalı erkekler ve 50 yaşın üstü Asyalı kadınlar, sirozlu kişiler, ailede HSK öyküsü olanlar, 20 yaşın üstü Afrikalılar ve aralıklı ya da sürekli ALT yüksekliği ve/veya HBV DNA $>2,000$ IU/ml olanlarda her 6-12 ay ara ile ultrasonografi ve AFP ile taranması önerilmektedir. HBeAg - pozitif kronik hepatit B'li hastalarda ALT düzeyinin normalden 2 kat yüksekliği ya da karaciğer biyopsisinde orta/şiddetli hepatit tablosu varlığı ve HBV DNA $>20,000$ IU/ml olması durumunda tedavi düşünülmelidir. Kompanse karaciğer hastalığı olan hastalarda spontan HBeAg serokonveriyonu açısından tedavide 3-6 ay beklenilmesi önerilmektedir. Hastada ikter, ALT alevlenmesi varlığında hemen tedaviye başlanmalıdır. ALT düzeyi sürekli normal ya da hafif artış (normalin iki katından az ALT artışı) gösteren hastalarda genellikle tedavi düşünülmemelidir. Transaminaz düzeyleri dalgalı seyir ya da hafif artış gösteren,

40 yaş üstü hastalarda karaciğer biyopsisi yapılmalıdır. Karaciğer biyopsisinde orta/şiddetli inflamasyon veya fibrosis varlığında tedaviye başlanmalıdır. HBeAg-pozitif, serum HBV DNA yüksek fakat ALT seviyesi normal hastalarda; 3-6 ay ara ile ALT düzeyinin takibi, yükselmesi durumunda daha sık ara ile ve HBeAg her 6-12 ayda bir izlenmelidir. HBeAg pozitif, HBV DNA>20, 000IU/ ml olan hastalar 3-6 aylık takipden sonra ALT seviyesi normalin üst sınırının 1-2 katı yüksek ise ya da HBeAg pozitif, HBV DNA>20000IU/ ml ve hasta 40 yaşın üzerinde ise karaciğer biyopsisi yapılması ve orta/şiddetli inflamasyon varlığında ya da önemli fibrosis varlığında tedavi düşünülmelidir.

HBeAg pozitif, HBV DNA>20,000IU/ml 3-6aylık takiblerinde ALTdeki artış normalin üst sınırının 2 katından yüksek ise tedavi düşünülmelidir.

HBeAg negatif, anti-HBe-pozitif, normal ALT düzeyi olan ve HBV DNA<2,000IU/ml inaktif hepatit B taşıyıcılarında, ilk yıl 3ay ara ile daha sonra her 6-12ayda takip önerilmektedir. Kronik HBV tedavisinde ALT normal ya da hafifçe yüksek(<2 kat) HBV DNA 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında seyreden hastalarda karaciğer biyopsisi yapılması ve hastalık aktivitesine göre tedavi kararı verilmelidir⁽⁸⁶⁾.

Kronik HBV enfeksiyonu olan ve HBV DNA'sı yüksek, transaminazları normal kişilerde durum tartışmalıdır. Yapılan bir çalışmaya göre ALT sürekli normal olan kişilerin % 24'de karaciğer biyopsisinde evre 2-4 fibrosis saptanmıştır. Bu nedenle ALT'nin üst sınırı kadınlarda<19 IU/L, erkeklerde<30 IU/L normal kabul edilmesi gerektiği ve bu kişilerde karaciğer biyopsinin yapılarak anlamlı fibrosis varsa tedavi başlanması gerektiği vurgulanmıştır. Bu kişilerde erken ve gerekli olmayan bir zamanda tedavi başlanırsa uzun vadede direnç problemlerinin ortaya çıkması kaçınılmaz olacaktır. Ancak ALT'si normal kişilerde sinsi giden ve oynamalar gösteren bir viremi olabileceği, bu hastalarda ilerleyici ciddi histolojik hasar bulunabileceği düşünülürse erken tedaviye alınması avantajlı olacaktır⁽⁸⁷⁾. Sirotik evrede kronik hepatitB'de hem dekompanasyonu önlemek hemde diğer komplikasyonlarından korunmak için HBV DNA düzeyinin cut off değeri daha aşağı çekilmelidir. Dekompanse sirozlu hastalarda da transplant öncesi verilecek nükleozit/nükleotid analogu tedavisi evrelemeyi iyiye doğru değiştirmekte ve hemde komplikasyonları önlemektedir.

Tablo 2. Kronik HBV tedavisinde kılavuz önerileri^{(86, 87, 88,}

	AASLD	APASL	EASL	Kefe et al
Karaciğer biyopsi	HBeAg(+),	Tespit edilebilir HBV DNA	↑ALT veya HBV DNA>2000	normal ALT HBeAg(+)
	Sürekli ALT> 1-2 xULN	ALT ↑		yaş>35-40, HBV DNA≥20000 IU/ml
	veya >40 yaş			
	HBeAg(-) ,	Normalin üstü ALT ve >40 yaş		HBV DNA≥2000 IU/ml , HBeAg(-)
Tedavi	HBV DNA 2000-20000IU/ml			
	Sürekli ALT> 1-2 x ULN			
	Sürekli ALT> 1-2 x ULN	HBV DNA≥20000 IU/ml	HBV DNA>2000 IU/ml	HBV DNA≥20000 IU/ml
	orta veya ileri inflamasyon veya fibrozis	ve ALT > 1-2 xULN	orta veya ileri inflamasyon veya fibrozis	ALT>1xULN
HBeAg(-)	Sürekli ALT> 1-2 x ULN	HBV DNA≥2000 IU/ml		
	ve HBV DNA≥20000 IU/ml	ve Sürekli ALT> 2 xULN		
		veya hepatik dekompanse		
	orta veya ileri inflamasyon veya fibrozis	orta veya ileri inflamasyon veya fibrozis		ALT>1xULN
Siroz	Dekompanse	Dekompanse	Dekompanse	Dekompanse
	Kompanse		Kompanse ve HBV DNA>2000IU/ml	Kompanse ve tespit edilebilir HBV DNA

*HBV DNA>2000 IU/ml

*Eğer ALT↑ ,HBV DNA<2000 IU/ml

Mevcut tedavi seçenekleri (interferon, pegile interferon, lamivudin, adefovir, entekavir, telvibudine, tenofovir) kalıcı bir HBsAg serokonversiyonu sağlamaktan uzaktır. İnterferon (IFN) ile sağlanan HBeAg ve HBV DNA yanıtları nükleotit/nükleozid analogları ile sağlanandan daha kalıcı olmakla birlikte oran oldukça düşüktür. Antiviral tedavi ile viral klirens sağlamak güçtür. Bunda replikatif araçların kovalent bağlı çembersel DNA'nın (covalently closed circular-cccDNA) rolü büyüktür. Konak genomu için bir havuz oluştururlar ve re-enfeksiyon olmadan replikasyonu yeniden sağlarlar. Bu enfektif araçların eradikasyonu çok zordur. Antiviral tedavi ile sağlanan viral yükte azalma T hücre yanıtında belli ölçüde düzelemeye yol açsa da viral eradikasyon sağlamaya yetmez.

2.2.6.1. Kronik Hepatit B Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

İnterferon –Alfa (IFN-alfa);

Antiviral, antiproliferatif ve immünmodülatör etkilidir. Konağın hücresel immün yanıtını güçlendirir, viral DNA sentezini inhibe eder ve antiviral enzimleri aktive eder. HBV ile enfekte hepatositlere karşı hücresel immün yanıtı Klas I histokompatibilite antijenlerinin ekspresyonunu artırarak ve yardımcı T lenfositler ile doğal öldürücü lenfositleri uyararak abartılı hale getirir. İnterferon tedavisinin avantajları; tedavi süresinin belirli olması, tedaviye dirençli mutantların gelişmemesi ve kalıcı yanıtın daha uzun süreli olmasıdır. Ancak IFN'lar önemli yan etkilere sahip ilaçlardır ve tedavinin bırakılmasına yol açabilirler. Dekompanse karaciğer hastalığı olanlarda kullanılmaz. Bu nedenlerle tedavi süresinin belirli olmasını isteyen, genç ve gebe kalmayı planlayan, viral yükü düşük, transaminazları yüksek hastalarda iyi bir tedavi seçeneğidir. Standart interferon yerini yarılanma ömrü daha uzun olan pegile interferona (PEG-IFN) bırakmıştır. PEG-IFN'ler; interferon molekülüne polietilen glikol eklenmesiyle molekülün yarı ömrünün uzatılması ve daha uzun süreli etki sağlanmıştır. PEG-IFN alfa 2a ve 2b olmak üzere iki tipi vardır.

İnterferon Tedavisinin Yan Etkileri;

Standart IFN ve PEG-IFN tedavisinde yan etki profili benzerdir. En sık rastlanan yan etkiler influenza benzeri hastalık bulguları, ateş, titreme, baş ağrısı, halsizlik, kas

ağrıları, enjeksiyon yerinde reaksiyon, anksiyete, depresyon, intihar teşebbüsü, saç dökülmesi, kilo kaybı, iştahsızlıktır. Otoantikorların gelişimine neden olabilir. IFN'ler miyelosüpresiftir, belirgin nötropeni ($<1000/\text{mm}^3$) ve trombositopeni ($<50.000/\text{mm}^3$) nadirdir. Özellikle sirotik zeminde hepatik alevlenme ve dekompanseasyona neden olabilir.

Antiviral İlaçlar;

Lamivudine, adefovir, entekavir, telvubidine, tenofovir gibi antiviral ilaçlar HBV replikasyonunu baskılamada kullanılmaktadır.

Lamivudine;

Kronik HBV tedavisinde ilk kullanıma giren L-nükleozit analogudur. Bir siklik nükleozit analogu olan lamivudine intrasellüler hepatosit kinazlar tarafından fosforile edilerek aktive metaboliti trifosfata dönüşür. Bu form, HBV polimerazın doğal substratı olan nükleotit trifosfatla yarışmaya girerek polimeraz enzimini bloke edip viral replikasyonu engeller. Bu ilaca karşı zaman içerisinde direnç gelişimi kronik HBV tedavisinin temel konularından biridir. Polimeraz geninin revers transkriptaz proteini üzerindeki C ve B bölgelerindeki mutasyonlar lamivudine direncinden sorumlu temel mutasyonlardır. Tirozin-methionin-aspartat-aspartat (YMDD) motifi üzerinde gelişen direnç genellikle metionin'in valin ya da izolösine dönüşümü şeklindedir (rtM204V/I vertA181T/V). Diğer bir primer mutasyon rtA181T/V'dir. Bugüne kadar lamivudine 5 farkı direnç paterni saptanmıştır. Bunlar rtM204I, rtL180M+rtM204V, rtL180M+rtM204I, rtV173L+rtL180M+rtM204V, rtL80V/I +rtL180M+rtM204I'dir.

Lamivudine direnci ile ilgili risk faktörleri arasında; tedavi süresinin uzunluğu, tedavi öncesi yüksek HBV DNA yer almaktadır. Genotipik direnç bir yıl lamivudine alan hastalarda % 14-32, tedavinin 5. yılında % 50-60 lara yükselmektedir⁽⁹⁰⁾.

Adefovir;

Revers transkriptaz ve DNA polimerazı inhibe ederek HBV DNA zincirinin sonlanmasına neden olur. Adefovir direncinin ilk yıllarda düşük olmasına rağmen, 5 yılda % 29'lara çıktığı bildirilmektedir⁽⁹¹⁾. Adefovir direnç mutasyonlarından sorumlu gen bölgeleri DNA polimerazın D bölgesinde bulunan rtN236T ile B bölgesinde

bulunan rtA181V/T mutasyonlarıdır. Adefovir direnci için risk faktörleri suboptimal viral supresyon ile lamivudine direncidir.

Entekavir;

2-deoksiguanozinin bir karbosiklik analogudur ve konak hücre selüler kinazları tarafından fosforillenerek aktif form olan entekavir trifosfat formuna dönüşür. HBV replikasyonunu 3 ayrı basamakta inhibe etmektedir. Bunlar; HBV DNA polimeraz primerlerinin oluşumunun inhibisyonu, pregenomik RNA'dan HBV DNA'nın negatif zincirinin reverz transkripsiyonu ve HBV DNA pozitif zincirinin sentezinin inhibisyonudur. Entekavir direncinin gelişmesi için lamivudine direnç mutasyonlarının yanında (rtN204V, rtL180M) HBV polimerazda ek mutasyonların (rtI169T, rtT84S/A/I/LG/C/M, rtS202G/C/I, rtM205I/V) da olması gerektiği bildirilmiştir. Nükleozit naiv hastalarda 5.yılda entekavir direnci % 1,2 iken, lamivudin dirençli hastalarda entekavir direnci 1. yılda % 6, 2.yılda % 15, 3.yılda % 35, 4.yılda ise % 43 olarak bildirmektedir⁽⁹²⁾.

Tenofovir Disoproxil Fumarat;

Bir asiklik nükleotit analogudur. Tenofovir ile ilgili klinik deneyimler HIV/HBV koenfekte hastalar ile lamivudin dirençli HBV hastalarındadır. HBV/HIV koenfekte iki hastada DNA polimerazın B domaininde rtA194T mutasyonu ile oluşan tenofovir direnci saptanmıştır⁽⁹³⁾. Ancak bu mutasyonun tenofovirin etkinliğini azaltıcı yönde bir etkisinin olup olmadığı net olarak belirlenmemiştir.

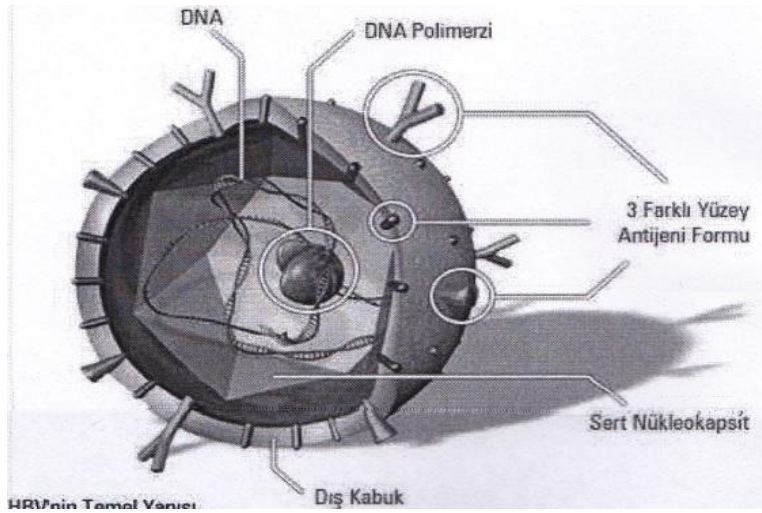
Lamivudin dirençli mutantların(rtM204I/V, rtL180M ve rtL173M) tenofovire duyarlı oldukları bilinmektedir. Adefovir direncinden sorumlu mutasyonlardan ise rtA181V/T direncinden tenofovir etkilenmezken, rtN236T direnci varlığında ise tenofovire duyarlılık azalması bildirilmektedir. Klinik olarak tenofovir direncinden bahsedilmemektedir.

2.2.7.Hepatit B Virüsün Moleküler Yapısı ve İmmünoloji:

HBV, hepadnaviridae ailesinin orthohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift (% 70), kısmen tek iplikli (% 30) çembersel DNA'dan oluşan bir DNA virusüdür. Viral genom sadece 3200 nükleotidden oluşan 42

nm çapında, küresel şekilde, ortada çekirdek (cor), etrafında zarf (yüzey antijeni) olan komplet virüs (dane partikülü) veya sadece zarf proteininden oluşan içinde nukleik asit bulunmayan non-infektif küresel ve tübüler yapılardan oluşur.^(94, 95) HBV'de genetik bilgi uzun sarmal üzerinde kodlanmıştır ve S, C, X ve P diye isimlendirilen dört değişik protein kodlayan nukleik asit dizisine(ORF) sahiptir. S geni, yüzey proteinlerini kodlar, üzerinde pre-S1, pre-S2, S olmak üzere üç bölge bulunur. C geni, kor antijenini (HBcAg) kodlar, üzerinde pre-C ve C bölgeleri bulunur. X geni, HBxAg'yi kodlar, hücresel ve viral genlerin transaktivasyonunda da rol oynar.

P geni ise DNA Polimerazı kodlar, reverstranskriptaz fonksiyonunda vardır.



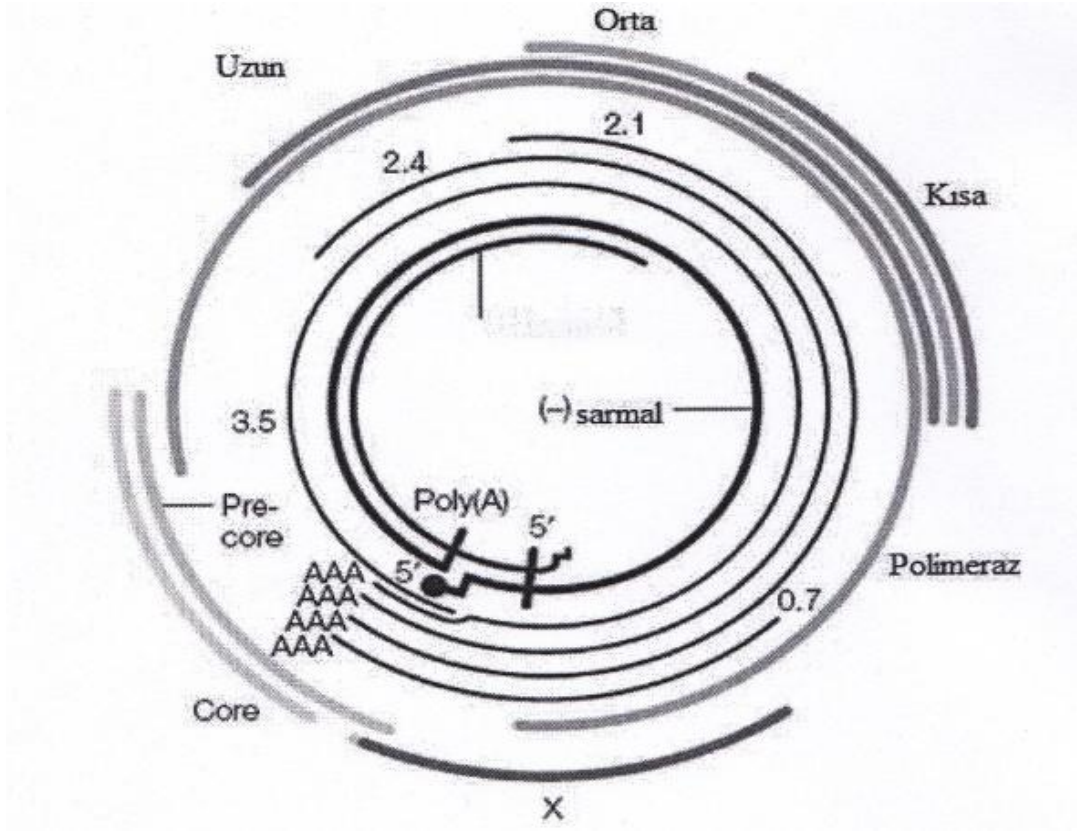
Şekil 4 HBV Temel Yapısı⁽⁹⁶⁾

Virüsün hepatosite tutunmasını organize eden genomun pre-S1 ve pre-S2 bölgeleridir. Virüs hepatosite girdikten sonra viral DNA ile nükleokapsid viryondan ayrılır ve hepatosit çekirdeğine taşınır, kovalent bağlı çembersel DNA (covalently closed circular-cccDNA) meydana gelir. Bu basamak viral genom replikasyonunun ilk ve en önemli aşamasıdır. ccc-DNA'dan konak hücre RNA'sı yardımı ile viral RNA'lar salgılanır. viral Messenger RNA'lar çekirdekten sitoplazmaya geçer ve burada yeniden HBV DNA sentezlenir. Oluşan HBV çekirdeği sitoplazmada sentezlenen kılıf antijeni ile sarılır ve komplet virüs yapılmış olur. Komplet virüs ve yapılan kılıf antijenleri

hücre dışına veya kana verilir. Ayrıca sentezlenen virüs yeniden nukleus içine girerek hücre içinde reenfeksiyonun sürmesini sağlar.

Normal immün yanıtı olan kişilerde HBV enfeksiyonunu takiben hepatosite giren HBV'nin immün sistem tarafından tanınması gerekir. Virusla temastan sonra hepatositte salınan IFN alfa ve gama, major histokompatibilite kompleksi (MHC) klas I ve II'yi uyarır. MHC klas I, HBV'nin hücre içindeki antijenik yapılarını hepatosit yüzeyindeki CD8⁺ T hücrelerine tanıtır. Daha sonra Fas ligand, sitokinler ve perforinler aracılığı ile enfekte hepatosit apoptoza uğratılır ve yok edilir. MHC Klas II ise HBV'nin plazma HBcAg ve HBeAg gibi antijenik yapılarını makrofajlar üzerindeki CD4⁺ T hücrelerine sunar ve onları hassas hale getirir. CD4⁺ T'lerden İL 2, 4, 6, 10, TNF- α ve INF- γ salınır. İmmün aracılı eliminasyon mekanizmaları enfekte hücreleri ortadan kaldırarak enfeksiyonun sonlanmasını sağlayabileceği gibi kronik nekro-inflamatuvar aktiviteye ve karaciğer kanserine de neden olabilir⁽⁹⁷⁾.

Konağın hücresel ve humoral immünite unsurlarına rağmen bir grup hastada HBV kronikleşir. Enfeksiyonun alındığı yaş, viral yük, genotip ve konağın genetik yapısı gibi birçok faktör kronikleşmede rol almaktadır. T hücre yanıtındaki yetersizlik kronisite ile ilişkilidir. Transgenik farelerde HBeAg'nin T hücrelerini tolerojen hale getirdiği gözlenmiştir, bu kronikleşme yönünde sitokin imbalansı oluşturmaktadır⁽⁹⁸⁾.



Şekil 5 HBV Genomik Yapısı⁽⁹⁹⁾

2.2.8.PD-1 Gen Polimorfizmi:

PD-1 geni; programlı hücre ölüm reseptörü 1 (PD-1) 2q37.3 kromozomda yeralan 288 aminoasitten oluşan CD28/B7 kostimulatör molekül ailesinin üyesi olup tip 1 transmembran reseptör proteindir. PD-1; CD4⁺T hücreleri, CD8⁺T hücreleri, CD⁺25 hücreleri, doğal ölüm hücreleri ve aktive olmuş monositlerden eksprese olan aynı zamanda CD279 olarak adlandırılan bir reseptördür⁽¹⁰⁰⁻¹⁰⁶⁾. T hücre reseptör (TCR) veya B hücre reseptör sinyalleri PD-1 ekspresyonuna neden olarak TNF ekspresyonu artırmaktadır. PD1 iki liganda sahip olup bunlardan PD-L1'in ekspresyonu, PD-L2 (ayrıca B7-DC ve CD273 olarak adlandırılır) ligand ekspresyonuna göre çok fazladır^(100-103, 107, 108). PD-L2, dendritik hücreler (DC), makrofajlar ve kemik iliğinden türeyen mast hücrelerinden eksprese olur.⁽¹⁰⁷⁾ Buna zıt olarak PD-L1 (ayrıca B7-H1 ve CD274 olarak adlandırılır) mürin T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler, makrofajlar, mezankimal kök hücrelerinden ve kültüre edilmiş kemik iliğinden türeyen mast hücrelerinden eksprese edilir^(107, 109). PD-L1 ekspresyonu aktive edildikten sonra ileri

derecede düzenlenmeye uğrar. Farelerdeki PD-L1 ekspresyonu insanlardakinden daha fazladır. Farelerde PD-1 hematopoietik olmayan hücre tiplerinden eksprese olur. Bu hücreler vasküler endotel hücreler, epitelium hücreler, kas hücreleri, hepatositler, pankreas hücreleri ve beyin astrosit hücreleridir. Ayrıca plasenta ve gözden de eksprese olmaktadır.^(110,111) PD-L1'in lenfoid olmayan dokularda yarı reaktif T ve B hücrelerinin ve inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. IFN- α , IFN- β ve IFN- γ PD-L1'in regülasyonunu artırırken, PD-L2'nin regülasyonunu azaltır, IL-4 ve granülosit-makrofaj koloni-uyarıcı faktör (GM-CSF) PDL2'nin ekspresyonunu dendritik hücrelerde uyarırken, IL-10 monositlerde PD-L1'in ekspresyonuna neden olur.⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾ PD-1 reseptörü bir hücre yüzey monomeri olup iki tirozin-temelli sinyal motifi içeren bir stoplazmik alandan ve tek immünglobülin değişken-benzeri alandan ibarettir.⁽¹¹³⁻¹¹⁸⁾ T hücre ya da B hücre reseptörleri PD-L1'e bağlandığında bir inhibitör sinyal dönüştürücü olarak görev yapar. İmmünoreseptör tirozin-temelli anahtar motifinde yerleşmiş bulunan ikinci tirozin rezidülerinin fosforilasyonu fosfataz SHP-2 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11) ve SHP-1 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1)'in PD-L1'in stoplazmik alanında toplanmasını sağlar. Fosfatazların toplanması T ve B hücre reseptörlerince aktive edilen efektör moleküllerin (fosfatidilinositol-3-hidroksil kinaz gibi) defosforilasyonuna öncülük eder. İlave olarak, PD-L1 sinyalleri CD-28 aracılığı ile aktive olan fosfatidilinositol-3-hidroksil kinaz aktivasyonunu azaltarak Akt kinazın fosforilasyonunu, glukoz metabolizmasını ve yaşamsal protein Bcl-x_L'nin gen ekspresyonunu baskılar. PD-L1 ekspresyon miktarı, bağlanma derecesi, T hücre aktivasyonu ve sitokin üretim sayısı PD-L1'in ligandları ile düzenlenir. PD-L1 ve PD-L2'nin fonksiyonunun sadece T hücre aktivasyonu üzerindeki etkileri anlaşılmaya başlandı. Bazı *in vitro* çalışmaların sonucu bu iki ligandın T hücre proliferasyonu ve sitokin üretimini inhibe ettiği yönünde olup, diğer çalışmalar da ise PD-L1'in T hücre aktivasyonunu artırdığı yönündedir. Bu tartışmalı sonuçların sebebi henüz belli olmayıp bunun sebebinin PD-L-immünglobülin kaynaşma proteinin agonist yada antagonist olarak değerlendirilmesinden kaynaklanmaktadır. PD-L1 ve PD-L2 çift yönlü sinyallere sahip olabilmektedir. Bunun aydınlatılması için aynı hücre tiplerinde ve T hücreleri üzerindeki fonksiyonel etkilerinin araştırılması ve kıyaslanması için daha ileri çalışmalar gerekmektedir^(114-116, 118).

2.2.8.1.PD-1-PD-L Fonksiyonunun Tolerans ve Otoimmünitedeki Rolü:

PD-1-PD-L yolağı uyarıcı ve inhibitör sinyaller arasındaki dengeyi düzenleyerek mikroplara karşı etkili immün yanıt ve self-toleransın korunmasında rol oynar. PD-1 ve onun ligandları merkezi ve periferik tolerans mekanizmasını etkiler. Bu yolağı timositlerin olgunlaşma safhalarında karar verici role sahiptir. PD-L1 timusun korteksinde geniş bir şekilde eksprese edilirken, PD-L2'nin ekspresyonu kısıtlıdır.^(110,115)

PD-1, CD4⁺ ve CD8⁺'in her ikisinde (-) olan timositlerden eksprese edilir. Yeniden düzenlenen T ve B hücre reseptör genlerini içeren timositlerin seçimi için gereklidir. PD-1 ekspresyonu CD4 ve CD8'in her ikisinde (+) olduğu timositlerin üzerindeki T hücre reseptörlerine bağlandıktan sonra upregüle olur ve PD-1 TCR sinyal eşiklerinin kontrolü yoluyla α , β TCR'lerinin seçimine katkıda bulunur. PD-1 iki yönlü davranarak pozitif seçimi artırabilir veya negatif seçime katkıda bulunabilmektedir⁽¹¹⁶⁾. PD-1 eksikliğinin farelerin otoimmün fenotipi üzerine etkisi merkezi ve periferik toleransı bozabilmektedir.^(117,118)

PD-1 ligand ekspresyonu plasenta ve göz gibi immün-ayrıcılık alanları immün yanıttan korumaktadır. İnsanlarda, PD-L1 plasental sinsitiotroblastlardan fazlaca eksprese olurken PD-L2 plasental vasküler endotel hücrelerden eksprese olmaktadır. PD-L1 ayrıca plasental eksomlardan eksprese olarak T hücre aktivasyonunu inhibe etmektedir.

PD-L1 ekspresyonu plasentada artan oksijen ile upregüle olurken azalan oksijen miktarı ile hızlıca son bulur. PD-L1 fonksiyonu plasentada fetal-maternal toleransı geliştirmektedir. PD-L1'e karşı üretilen antikorların verilmesi, plasentaya geçişi artan T hücreler ile ilişkili olarak allojenik fetusların düşük oranını artırmaktadır.^(110,119-121) Yapılan çalışmalarda PD-1-PD-L1 etkileşimleri aktive olmuş T hücrelerden korunan gözdeki immün ayrıcalıklı alanlar için bir anahtar role sahiptir. PD-L1 kornea, iris ve retinada eksprese olurken PD-1 ve PD-L2 buralarda eksprese olmazlar. PD-1 veya PD-L2'ye spesifik antikorların inhibe edilmesi sonucu kornea doku reddinin hızlandığı görülmektedir. T hücre aktivasyonunu *in vitro* PD-L1-immünglobülin füzyon proteini inhibe eden nakil edilen korneanın *in vivo* daha uzun süre canlı kalmasını sağladığı ve tamamen inflamatuvar hücre infiltrasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Yürütülen çalışmalar. PD-1'in perifer CD8⁺ T hücre toleransında önemli olduğunu ve bu yolağın

self-reaktif T hücre yanıtının inhibisyonunda PD-1 inhibitör sinyallerini tetikleyerek otoimmün hastalıkların iyileştirilmesinde yararlı bir strateji olabileceğini göstermektedir. Otoimmünite fare modeli çalışmalarında PD-1 ve ligandlarının immün düzenleyici rolünün önemli olduğu ve nonobese diabetik (NOD) farelerdeki çalışmada PD-1 ve PD-L1'in inhibisyonunun (fakat PD-L2 değil) hızlı ve daha da kötüleşen diyabete neden olduğu ve çok fazla CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin IFN- γ ve tümör nekroz faktör sentezlediği yönündedir. Birçok veriye göre antikorlarca bloklanan PD-1-PD-L1 yolağının inhibitör fonksiyonu, otoimmün hastalıkların gelişmesine katkıda bulunduğu ve bu hastalıkların tedavisinin PD-L1 ekspresyonunu artırarak giderilebileceği düşünülmektedir.⁽¹²¹⁻¹²⁵⁾

2.2.8.2.Enfeksiyon Hastalıklarında PD-1-PD-L1 Etkileşimleri

PD-1- PD-L1 yolağı konak savunmasında çeşitli etkileşimlerle mikrobiyal patojenlerin eradike edilmesinde ve mikrobiyal stratejilerde immün yanıtı direnç göstermede merkezi bir yolaktır. Kronik enfeksiyona sebep olan birçok mikroorganizma PD-1- PD-L1 yolağını kullanarak immün yanıtı kaçmaktadır. Birçok çalışmada kronik enfeksiyon süresince PD-1- PD-L1 yolağının immün aracılıklı doku hasarında düzenleyici olduğu sanılmaktadır.

Karaciğer enfeksiyonlu fare modelinde PD-1 ekspresyonunun sürekli bir şekilde T hücre fonksiyonu ile ilişkili olarak hasarlı doku bölgesinde arttığı gösterilmiştir⁽¹²⁶⁾. PD-1- PD-L1 yolağı inhibe edilen farede adenovirüs enfeksiyonun çok hızlı bir şekilde eradike edildiği fakat çok hızlı hepatoselüler hasarın gerçekleştiği, buna karşın PD-1-PD-L1 yolağı mevcut olan farede böyle bir durumun olmadığı gösterilmiştir⁽¹²⁷⁾.

Birçok çalışmada, PD-1- PD-L1 yolağının saldırgan T hücrelerinin neden olduğu doku hasarını sınırladığını ve antiviral immüniteyi etkilediğini gösteren veriler vardır. Akut enfeksiyon ve aşılama sonrası etkili antiviral T hücreleri antijenlere karşı multi efektör fonksiyonlar (sitokin üretimi, perforin ve granzim aracılıklı sitotoksite ve proliferasyon) kazanırlar. Hafıza T hücreleri, IL-7 ve IL-15 homeostatik çoğalma aracılığı ile antijenden bağımsız yolda sürekli bir yetenek kazanır.⁽¹²⁸⁻¹³⁰⁾ Buna zıt olarak kronik viral enfeksiyonlar sık sık T hücre fonksiyon bozukluğu ile karakterizedir. Örneğin, kronik lenfositör koriyomenenjit (LCMV) enfeksiyonunda virüse spesifik CD8⁺ T hücreleri sitokin üretmede, infekte hücreleri lisiz etmede ve çoğalmada yetenek

kaybına uğrarlar^(130,131). Daha az yaşlanmış T hücreleri çok daha etkili bir şekilde terapötik aşılama ve insan immün yetmezlik virüs (HIV) enfeksiyonunda kontrolün sağlanmasında multi-fonksiyonel koruma gösterirler⁽¹²⁹⁾. T hücrelerinin tam fonksiyonel zararlarının farklı olmasına rağmen, T hücrelerinin fonksiyon kaybının kronik enfeksiyona neden olduğu, aşırı immünopatolojik koruma için kritik bir değer olabileceği ve belkide uygun antiviral immünite için zararlı olabileceği sanılmaktadır^(129,130,132).

2.2.8.3.PD-1 Polimorfizmi ve Hastalık İlişkisi

Sistemik lupus eritematosus (SLE), Tip 1 diyabet (Tip 1 DM), romatoid artrit (RA) ve multipl skleroz (MS) gibi otoimmün hastalıkların patogenezinin PD-1 polimorfizmi ile ilişkili olduğu ve bu polimorfizmin önemli bir fonksiyonunun bulunduğu gösterilmiştir.⁽¹³³⁻¹⁴²⁾

PD-1 polimorfizminin İsveç’li, Avrupa-Amerikalı ve Meksikalı hastalarda SLE’nin gelişmesiyle ilişkili olduğu, Danimarkalı hastalarda tip 1 DM riskini romatoid faktörü (RF) negatif olan Avrupalı hastalarda RA’i ve Alman hastalarda da MS’i artırdığı bildirilmiştir.^(135,137)

Bu tek nükleotid polimorfizmi (G7146A) hematopoiesizde önemli bir düzenleyici fonksiyona sahip olan transkripsiyon faktör RunX1’in (ayrıca AML-1 olarak adlandırılır) bağlanma alanında lokalizedir. RunX1’in bağlanma alanının bozulması PD-1 mRNA’sının stabilitesini veya miktarını değiştirebilmektedir. G7146A polimorfizmine sahip MS’li Alman hastalarda PD-1 aracılığı ile IFN- γ üretiminin durdurulmasının engellendiği bildirilmiştir.⁽¹³³⁾ İspanya’da yapılan bir çalışmada ise PD-1’in SLE hastalığına yatkınlığı ile ilişkisi onaylandığı halde polimorfizm ile ilişkisi olmadığı gösterilmiştir⁽¹⁴³⁾. Gözlenen farklılıkların sebebi farklı popülasyonların farklı genetiği sahip olması ile açıklanabilmektedir. G7146A dışındaki PD-1 geni intronundaki diğer polimorfizmlerin Çin popülasyonunda RA ile ilişkili olduğu fakat SLE ile ilişkili olmadığı bulunmuştur^(136,141). Ayrıca Tayvan’da SLE ile, Kore popülasyonunda ankilozan spondilit ile ve atopik insanlarda çim alerjenlere spesifik IgE yanıtı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu polimorfizmlerin çoğunun genin intronundaki korunmuş bölgede olduğu bulunmuştur⁽¹⁴⁴⁾.

2.2.8.4.PD-1 Polimorfizminin HBV ile İlişkisi

HBV enfeksiyonunun iyileşmesi ya da kronikleşmesini belirlemede adaptif immüitenin merkezi bir role sahip olduğu bilinmektedir⁽¹⁴⁵⁾ Kronik HBV enfeksiyonlu kişilerin periferik kanlarındaki ve karaciğerlerindeki T hücreleri fonksiyonel bozukluğa uğramaktadırlar. Sitotoksik T lenfosit (CTL) yanıtı, yüksek viral yüke sahip kronik HBV enfeksiyonlu kişilerde bozulmaktadır. Bununla birlikte yaşlanmış hafıza T hücrelerinin moleküler mekanizmalarının temeli henüz anlaşılamamıştır. HBV enfeksiyonunun immünopatogenezinin anlaşılması HBV enfeksiyonunun kontrolü ve etkili tedavi stratejilerin geliştirilmesi için çok önemlidir.⁽¹⁴⁶⁻¹⁴⁸⁾ T hücreleri ve antijen sunucu hücrelerden eksprese olan pozitif ve negatif kositümülâtör moleküllerin T hücre yanıtında belirleyici olduğu bilinmektedir^(149,150). Birçok kositümülâtör moleküller arasında PD-1 ve PD-1 ligantları immün yanıtın düzenlenmesi ve ayarlanmasında önemli bir yolağı oluşturmaktadır⁽¹⁵¹⁻¹⁵³⁾. Son yapılan çalışmalara göre yaşlanmış virüs spesifik CD8⁺ ve CD4⁺ hücrelerinin kronik viral enfeksiyonda aşırı PD-1 molekülleri eksprese etmelerine rağmen, bu moleküllerin down regülasyonu sonucu infekte hücreler apoptoza karşı direnç göstermektedirler.⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁸⁾ PD-L1 ekspresyonunun HIV ile infekte kişilerde arttığı bildirilmiştir. Bu verilere göre PD-1/PD-L1 yolağı farelerde ve insanlardaki kronik viral enfeksiyonlarda (HIV, HCV, HBV gibi) virüs spesifik CD8⁺ hücrelerinin fonksiyonlarının inhibisyonunda hayati bir role sahiptir. Yapılan bu çalışmalarda HBV spesifik T hücre yanıt seviyesindeki bozulmanın derecesinin PD-1 ekspresyonu ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Virüse spesifik T hücre yanıtını etkileyen PD-1/ PD-L1 kositümülâtör yolağının apoptozun başlatılmasında temel mekanizma olduğu düşünülmektedir. HBV enfeksiyonunda CD8⁺ hücre fonksiyonunun PD-1/ PD-L1 yolağı tarafından negatif düzenlendiği gözlenmiştir.^(159,160) Düşük PD-1 ekspresyon seviyesi ile düşük HBV viral yükü arasında ilişki saptanırken alevlenmenin göstergesi olan ALT düzeyi ile ilişkisi bulunmamıştır. Son yapılan çalışmalarda sürekli bir antijen uyarımının T hücre fonksiyonunu baskıladığı bildirilmiştir. Kısaca T hücreleri kendi yüzey reseptörü olan PD-1 ekspresyonunu upregüle ederek pozitif TCR sinyalini kısıtlayıp güçlü immün yanıtın oluşmasını engeller. Bu veriler ışığında PD-1-PD-L1 yolağının HBV tedavisinde baskılanıp baskılanmayacağı kararı güçlü bir tedavi stratejisi açısından aydınlatılması gereken önemli bir konudur.

Yapılan bu çalışmalardan yola çıkarak, Türk popülasyonundaki kronik hepatit B ile infekte hastalar ile HBV'ye karşı doğal bağışıklık geliştiren insanlarda PD-1 geni üzerinde bulunan polimorfizmlerin (G7146A ve T7209C) viral klirense etkisini araştırmayı amaçladık.

3.GEREÇ ve YÖNTEM:

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Balcalı Hastanesi Gastroenteroloji polikliniğine başvuran 385 bireyden (kronik HBV tanısı alan 220 hasta ve 165 spontan HBsAg klirensli sağlıklı bireylerden) toplanan periferik kan materyal olarak kullanıldı.

Çalışmada, kronik hepatit B'li hasta grubu ve spontan HBsAg klirensli sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu olmak üzere iki farklı deney grubu oluşturuldu. Kronik HBV'li hastalar ve hepatit B'ye karşı doğal bağışıklığı olan sağlıklı bireylerden oluşan çalışma grupları 2009-2011 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı'na başvurup, klinik, laboratuvar, radyoloji ve patolojik olarak kronik hepatit B tanısı konulan hastaların alındığı prospektif bir çalışmadır. Çalışma için Çukurova Üniversitesi Etik Kurul onayı alındı. Tüm hastalarda tam fiziki muayene yapıldı. Hastalardan hepatit markırları (HBsAG, antiHBs, anti-HBcIgG, anti-HCV), tam kan sayımı (CBC), protrombin zamanı (PTZ), uluslararası normalleştirme oranı (INR), ferritin, glukoz, üre, kreatinin (Cr), Aspartat Amino Transferaz (AST), Alanin Amino Transferaz (ALT), Albümin, total bilirubin, direk bilirubin, Total kolesterol, Trigliserid, Low Density Lipoprotein (LDL) ve High Density Lipoprotein (HDL) kolesterol düzeyleri çalışıldı. HBsAg(+) vakaların serumundan HbeAg, antiHbe, antidelta, serum alfa fetoprotein (AFP) ve PCR ile HBVDNA düzeylerine bakıldı. Knodell skoruna göre patolojik değerlendirme (histolojik aktivite indeksi (HAI), fibrosis skoru) yapıldı.

Çalışmaya alınan grublardan 0,5 molar (M) etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (5.4 mg) içeren vakumlu tüplere (BD Vacutainer®, İngiltere) 2 ml periferik kan alındı. Hasta ve kontrol grubu bireylerinden alınan periferik kanlar DNA izolasyonu yapılana kadar +4 °C'de saklandı. Periferik kandan genomik DNA izolasyonu kan alındıktan sonraki iki gün içinde yapılarak, izole edilen DNA'lar -80 °C'de çalışma gününe kadar muhafaza edildi.

Araştırmaya katılan çalışma ve kontrol grubu bireylerinin kanları gönüllülük esasına dayanarak etik kurallar çerçevesinde toplanmıştır. Hem hasta hem de kontrol

grubundaki gönüllüler, çalışmaya katılmadan önce çalışmanın amacı ve içeriği hakkında açık bir dille bilgilendirilmiştir.

Bu çalışmada, Türk popülasyonunda kronik hepatit B’li hastalar ile HBV’ye karşı doğal bağışıklık geliştiren insanlarda PD-1 genide bulunan polimorfizmlerin (G7146A ve T7209C) viral klirens etkilisini araştırmayı amaçladık.

Çalışma Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Gastroenteroloji Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Agaroz (Sigma)
- İzopropanol (Sigma)
- Brom Fenol Mavis (C₁₉H₉Br₄NaO₅S) (Sigma)
- Ksilen Siyanol FF (Sigma)
- Gliserol (Sigma)
- Trizma-Baz (Sigma)
- Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma)
- Borik Asit (Sigma)
- Suyla Hazırlanmış % 1’lik Etidyum Bromür Çözeltisi (Merck)
- DNA Polimeraz Enzimi (Fermentas)
- Deoksiribonükleosid Trifosfat (dNTP) Seti (Promega)
- DNA Marker (Promega)
- DNA İzolasyon Kiti (Roche)

3.1.1.2. PD-1 +7146 G → A (PD-1.3) Tek Nükleotid Polimorfizminin Analizinde Kullanılan Primer Çifti

PD-1 genindeki +7146 G → A (PD-1.3) tek nükleotid polimorfizmini saptamak için seçilen primer çifti ile PD-1 +7146 G → A tek nükleotid polimorfizminin oluşmasına neden olan nükleotidin de içinde bulunduğu 331 baz çiftlik (bç) bir DNA fragmenti amplifiye edilmiştir. Kullanılan primerlerin uzunlukları, erime sıcaklıkları (T_m), guanin-sitozin (GC) baz oranı ve baz dizisi Tablo 3’de gösterilmiştir. Primerler, liyofilize halde, 0.2 µmol sentez skalasında sentezlenmiş ve yüksek performanslı sıvı

kromatografisi (HPLC) ile saflaştırılmış ticari olarak (Ella Biotech GmbH Am Klopferspitz 1982152 Martinsried/Germany) satın alınan PD-1 +7146 G à A İleri primeri 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde üretici firmanın önerisi olan 666 µl aynı şekilde PD-1 +7146 G à A Geri primeri de 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde 582 µl PCR için uygun saflıktaki steril distile su ilave edilerek çözöldü ve -20 °C’de saklanmıştır.

Tablo 3. PD-1 Genindeki +7146 G à A Polimorfizmini Saptamak İçin Kullanılan Primerlerin Uzunlukları, Erime sıcaklıkları, GC Oranı ve Baz Dizisi.

Primer	Uzunluk (bç)	Tm (°C)	GC (%)	Baz dizisi
PD-1 +7146 G à A İleri	19	60.0	57.89	5’- CCA GGC AGC AAC CTC AAT C -3’
PD-1 +7146 G à A Geri	19	60.0	57.89	5’- GTC CCC CTC TGA AAT GTC C -3’

3.1.1.3. PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizminin Analizinde Kullanılan Primer Çifti

PD-1 genindeki +7209 C à T tek nükleotid polimorfizmini saptamak için seçilen primer çifti ile PD-1 +7209 C à T tek nükleotid polimorfizminin oluşmasına neden olan nükleotidin de içinde bulunduğu 499 baz çiftlik (bç) bir DNA fragmenti amplifiye edilmiştir. Kullanılan primerlerin uzunlukları, erime sıcaklıkları (Tm), guanin-sitozin (GC) baz oranı ve baz dizisi Tablo 4’de gösterilmiştir. Primerler, liyofilize halde, 0.2 µmol sentez skalasında sentezlenmiş ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile saflaştırılmış ticari olarak (Ella Biotech GmbH Am Klopferspitz 1982152 Martinsried/Germany) satın alınan PD-1 +7209 C à T İleri primeri 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde üretici firmanın önerisi olan 556 µl aynı şekilde PD-1 +7209 C à T Geri primeri de 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde 733 µl PCR için uygun saflıktaki steril distile su ilave edilerek çözöldü ve -20 °C’de saklanmıştır.

Tablo 4. PD-1 Genindeki +7209 C à T Polimorfizmini Saptamak İçin Kullanılan Primerlerin Uzunlukları, Erime Sıcaklıkları, GC Oranı ve Baz Dizisi.

Primer	Uzunluk (bç)	Tm (°C)	GC (%)	Baz dizisi
PD-1 +7209 C à T İleri	18	54.0	50.00	5'- CCC AAG TGT GTT TCT CTG -3'
PD-1 +7209 C à T Geri	18	50.0	38.89	5'- GCA TTC TTG CAG ATT TAG -3'

3.1.1.4. PstI Restriksiyon Endonükleaz

PD-1 +7146 G à A polimorfizmi bu çalışmada PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. PD-1 +7146 G à A polimorfizmi New England Biolabs (R0140S) firmasının ürettiği PstI restriksiyon endonükleaz enzimi ile belirlenmiştir.

PstI Enzimi Tanıma Bölgesi : 5'...C TGCA↓G...3'
3'...G↑ACGT C...5'

Optimum İnkübasyon Sıcaklığı :37°C

3.1.1.5. BstUI Restriksiyon Endonükleaz

PD-1 +7209 C à T polimorfizmi bu çalışmada PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. PD-1 +7209 C à T polimorfizmi New England Biolabs firmasının ürettiği BstUI restriksiyon endonükleaz enzimi ile belirlenmiştir.

BstUI Enzimi Tanıma Bölgesi: 5'...CG ↓CG...3'
3'...GC ↑GC...5'

Optimum İnkübasyon Sıcaklığı:60°C

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

- Santrifüjler
- Derin Dondurucular
- Steril Kabin
- Manyetik Isıtıcı ve Karıştırıcı
- Vorteks Aleti
- Kuru Isıtıcı
- Hasas Terazî
- Polimeraz Zincir Reaksiyon Aleti (Termal Cyclers)
- Jel Elektroforez Sistemi
- Jel Görüntüleme Sistemi
- Jel Analiz Sistemi
- Otomatik Mikropipetler

3.1.3. DNA İzolasyonu

3.1.3.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

PD-1 +7146 G → A ve +7209 C → T polimorfizmlerinin belirlenmesindeki ilk aşama, periferik kandan cam lifli filtreye nükleik asit bağlama metoduna göre gerçekleştirilen DNA izolasyonudur. Çalışmalar, ticari olarak satılan DNA izolasyonu kitinin (Yüksek saflıkta PCR için kalıp DNA hazırlama kiti (Roche)) protokolüne göre gerçekleştirildi.

3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'da dizisi bilinen belirli bir bölgenin çoğaltılmasına (amplifikasyon) olanak veren in vitro DNA sentez yöntemidir. PCR, 3 ana basamaktan oluşur.

1.Amplifiye edilecek çift iplikli DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu (denaturation=denatürasyon).

2.Primerlerin özgül hibridizasyonuna olanak sağlayacak sıcaklıkta [T_m (erime sıcaklığı) değerinin 3-5 °C altındaki sıcaklık] hedef bölgelere bağlanmaları (annealing=bağlanma).

3.Taq DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72 °C sıcaklıkta, primerlerden itibaren DNA zincirlerinin (ipliklerinin) sentezlenmesi (extension=uzama).

PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için gerekli temel bileşenler aşağıdaki gibidir.

Kalıp DNA: Saflaştırılan DNA, amplifiye edilecek DNA parçalarına kalıp görevi yapar.

Primerler (oligonükleotidler): Kullanılacak primerler yalnızca amplifiye edilecek bölgeye özel olmalıdır. Tipik primerler yaklaşık % 50 G+C bazlarına sahip 18-28 nükleotid uzunluğunda, sentetik olarak sentez edilmiş tek zincirli oligonükleotidlerdir.

DNA polimeraz: Termotabil karakterde DNA polimerazlardan PCR’de en yaygın kullanılanı *Thermus aquaticus*’dan elde edilen Taq DNA polimerazdır. Taq DNA polimeraz’ın polimerizasyon oranı (nükleotid/saniye) enzim için en uygun sıcaklık olan 70-80 °C’da 35-100’dür. 50 µl’lik bir reaksiyon hacmi için önerilen miktar 1.25 ünitidir (U).

MgCl₂: Mg⁺² iyonları dNTP’ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve çift iplikli DNA’nın Tm değerini artırır, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar. Genellikle optimum MgCl₂ konsantrasyonu olarak 1.0-2.5 mM’lık değer tercih edilir.

PCR tamponu: PCR için uygun tampon 10-50 mM arasında değişen Tris-HCl’dir. Tamponun pH’sı ise 8.3-8.8 arasında değişir. Bu tampona son konsantrasyonu 50 mM kadar KCl çözeltisi eklenmesi primerin kalıp DNA’ya yapışmasını kolaylaştırır.

dNTP Karışımı: Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 200 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir.

3.1.5.Agaroz Jel Elektroforezi

PCR işleminden sonra amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini ve PCR-RFLP sonucunda bireyin hangi genotipe sahip olduğu agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir.

3.1.5.1.PCR ve PCR-RFLP Örneklerinin Jele Konması ve Elektroforez

PCR’da DNA amplifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini, amplifiye edilen ürünlerin restriksiyon endonükleazlar ile kesilip kesilmediğini ve ARMS-PCR sonucunda hangi allelerin çoğalıp çoğalmadığını kontrol etmek amacı ile örnekler, işlemlerin bitiminden sonra % 2.5’lik agaroz jellere yüklendi.

3.1.6. PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi

3.1.6.1. PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizminin Saptamak Amacıyla Bu Polimorfizmin Olabileceği DNA Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

PD-1 +7146 G/A tek nükleotid polimorfizmi, PD-1 geninin 4. intronu içerisindeki transisyon şeklinde bir nükleotid değişimidir. Bu transisyon şeklindeki değişim Guanin’in Adenin’e (G/A) dönüşmesi sonucu meydana gelir. PD-1 +7146 G/A Tek Nükleotid Polimorfizminin olup olmadığı Hoffmann ve ark. (2010)’nın kullanmış oldukları PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. İçerisinde PD-1 +7146 G à A tek nükleotid polimorfizminin bulunduğu 331 baz çiftlik (bç) genomik insan DNA’sının polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu için PD-1 +7146 G à A İleri: 5’- CCA GGC AGC AAC CTC AAT C -3’ ve PD-1 +7146 G à A Geri: 5’- GTC CCC CTC TGA AAT GTC C -3’ primerleri kullanılmıştır. National Center for Biotechnology Information (NCBI) nükleotid veri tabanından alınan AF363458 rapor numaralı insan DNA sırası kullanılmış ve primerlerin uygunluğunun testi için online Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) programından yararlanılmıştır. Şekil 6’da kullanılan primerlerin PD-1 geni üzerindeki konumları (altı çizili ve kırmızı renkli nükleotidler) ve PD-1 +7146 G à A polimorfizminin bulunduğu bölge (mavi renkli nükleotid) gösterilmiştir.

```

CCCCACCTCC CCAGCCCCCA GGCAGCAACC TCAATCCCTA AAGCCATGAT CTGGGGCCCC
AGCCACCTG C
(G à A)
GTCTCCGGGG GTGCCC GGCC CATGTGTGTG CCTGCCTGCG GTCTCCAGGG GTGCCTGGCC
CACGCGTGTG CCCGCCTGCG GTCTCTGGGG GTGCCC GGCC CACATATGTG CCTGCCTGCG
GTCTCCAGGT GTGCCC GGCC CATGCGTGTG CCCACCTGCG AGGGCGTGGG GTGGGCTTGG
TCATTCTTA TCTTACATTG GAGACAGGAG AGCTTGAAAA GTCACATTTT GGAATCCTAA
ATCTGCAAGA ATGCCAGGGA CATTTCAGAG GGGGACATTG AGCCAGAGAG GAGGGGTGGT

```

Şekil 6. PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizminin Bulunduğu Bölgenin Çoğaltılmasında Kullanılan Primerlerin PD-1 Geni Üzerindeki Konumları ve Polimorfizminin Meydana Geldiği Nükleotid

DNA izolasyonu ile izole edilen DNA örneklerinden PD-1 +7146 G à A tek nükleotid polimorfizmini saptamak amacıyla, polimorfizminde içinde bulunduğu 331 bç.'lik bir gen bölgesi PCR ile çoğaltıldı. Her bir örnek için, daha önce otoklavda sterilize edilen 0.2 ml'lik PCR tüpünde 25 µl'lik bir PCR reaksiyonu hazırlandı. PCR protokolü aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır.

1.Tüm PCR eriyiklerinin bir araya konulduğu ana karışım 1.5 veya 2 ml'lik steril eppendorf tüpleri içerisinde hazırlandı. Tüplere pipetaj sırasındaki kayıplar göz önünde bulundurularak çoğaltılacak örnek sayısından 3-5 örnek kadar fazla olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı. Tablo.5'te ana karışımın hazırlanışı ve PCR eriyiklerinden 25 µl'lik bir PCR reaksiyonu için ne kadar alınması gerektiği ve eriyiklerin reaksiyondaki son konsantrasyonları gösterilmiştir.

2.Ana karışım vorteks ile karıştırıldıktan sonra çeperlere yapışan damlacıklardan da yararlanmak için çok kısa bir santrifüj (spin) (8000 devir/dakikada 10 saniye) ile tüm sıvı bir araya toplandı.

3.0.2 µl'lik steril PCR tüpleri etiketlendikten sonra PCR ana karışımından bunların her birine 17.5 µl konuldu.

4.Her etiketli PCR tüpüne aynı etikete sahip DNA tüplerinden 7.5'er µl DNA eklenerek her tüpün içinde 25 µl'lik PCR karışımı oluşturuldu. Negatif (su) kontrollerde aynı şekilde etiketlendi.

5.Bütün tüpler GeneAmp^R PCR System 9700 (Applied Biosystems) PCR cihazına yerleştirildi. Tablo 6'daki PCR protokolü programlanarak PCR cihazı çalıştırıldı.

6.Ardından PCR cihazından çıkarılan örnekler agaroz jel elektroforez ile analiz edilinceye kadar 4 °C’de saklandı.

Tablo 5. PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmini Saptamak Amacıyla Optimum Amplifikasyonun Gerçekleştirildiği PCR Reaksiyon Karışımı.

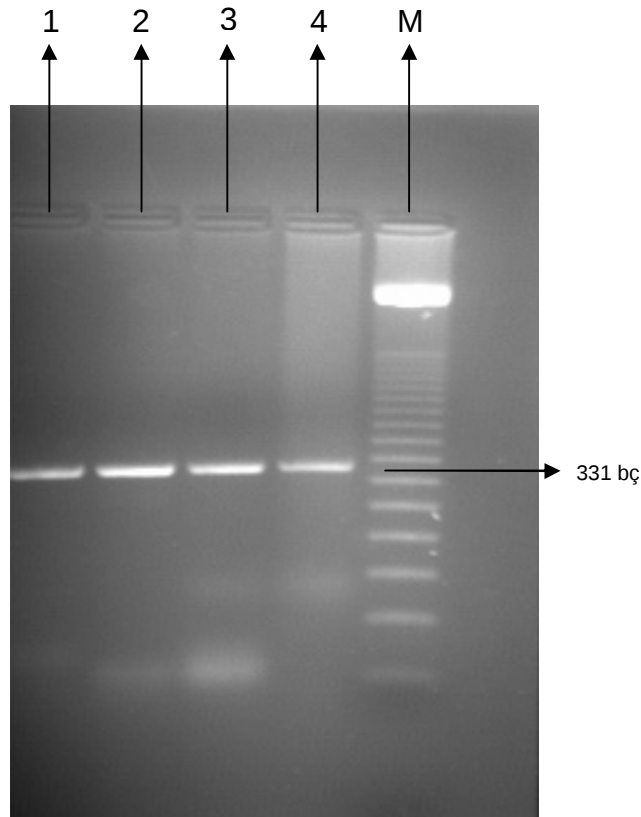
Malzeme	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon (25µl’de)	Alınan Miktar (µl)
PCR tamponu	10X	1X	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1.5 µl
dNTP karışımı	10 mM	200 µM	0.5 µl
PD-1 +7146 G à A İleri Primer	50 pmol/µl	12.5 pmol/µl	0.25 µl
PD-1 +7146 G à A Geri Primer	50 pmol/µl	12.5 pmol/µl	0.25 µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	3 U	0.6 µl
DNA	15-30 ng/µl	112.5-225 ng	7.5 µl
ddH ₂ O	--	--	11.9 µl

Tablo 6. PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmini İçin PCR Sıcaklıkları ve Döngü Sayıları.

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	3 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	35
Bağlanma (Annealing)	60	30 saniye	
Uzama (Extension)	72	30 saniye	
Son Uzama	72	5 dakika	1
Soğutma	4	--	--

3.1.6.2. PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmin Bölgesinin PCR İşlemi Sonucunda Görüntülenmesi

PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmin Bölgesinin PCR reaksiyonu ile çoğaltılması sonucunda bu bölgenin çoğaltılıp çoğaltılamadığı %2.5'luk agaroz jel elektroforez ile kontrol edildi. Birinci kuyucuğa DNA marker diğer kuyulara PCR ürünleri yüklendi. Jel 90 voltta 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. BioDoc IITM Biometra jel görüntüleme sistemi ile DNA bantları incelendi. PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmin bulunduğu bölge için 331 bç'lik 1 adet bant gözlenir (Şekil 7).



Şekil 7. PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmin Bölgesinin PCR Reaksiyonu İle Çoğaltılması Sonucu Oluşan DNA Parçasının %2.5'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü. M: DNA marker, 1-4: PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizminin Bulunduğu 331 bç'lik DNA fragmenti.

3.1.6.3. : PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmini Belirlemek İçin RFLP Analizi

Restriksiyon endonükleazlar (RE) çift iplikli DNA'yı kesen enzimlerdir. RE DNA diziliminde iki yönlü simetri oluşturan palindromik (her iki yönden de aynı biçimden okunan) bölgelerdeki baz dizilerini tanırlar ve bu dizilerden her iki DNA zincirini keserler. Bu enzimler bakterilerden izole edilir ve bakteriye giren viral DNA'yı parçalayarak bakteriyi virüs enfeksiyonundan korurlar. Restriksiyon enzimlerinin bilimsel adlandırılması izole edildiği bakterinin üç harfli kısaltmasını takip eden suş tanımlamasıyla beraber bulundukları sıraya göre romen rakamıyla yapılır.

PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmini RFLP yöntemi ile saptayabilmek için PstI restriksiyon enzimi kullanıldı. Bu enzim 5'...CTGCA ↓ G...3' sırasına sahip 6 nükleotidlik DNA bölgesini tanıır ve 3' tarafındaki GA bazları arasında yapışkan uç oluşturacak şekilde kesim yapar. Tablo 8'de PstI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi (altı çizili olan 6 nükleotid) gösterilmiştir. Bu tanıma bölgesi PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmini bulunduğu nükleotidi de içine almaktadır [çizelgede mavi renk ile gösterilen nükleotidler (+7146 G à A)]. Guanin'in (G) Adenin'e (+7146 G à A) dönüşmesi sonucu PstI restriksiyon enziminin tanıma ve kesim bölgesi tamamlanmış olur ve bu durumda enzim 331bç'lik DNA parçasını 276 ve 55 bç'lik iki parçaya böler.

CCCCACCTCC CCAGCCCCCA GGCAGCAACC TCAATCCCTA AAGCCATGAT CTGGGGCCCC
AGCCCAC <u>CTG C</u>
(G à A)↓
<u>G</u> TCTCCGGGG GTGCCCGGCC CATGTGTGTG CCTGCCTGCG GTCTCCAGGG GTGCCTGGCC

Şekil 8. PstI Restriksiyon Enziminin Tanıma Bölgesi ve PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmini Neden Olan Nükleotid

RFLP protokolü aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır.

1. RFLP reaksiyonu için gerekli ana karışım, 1.5 veya 2 ml'lik steril eppendorf tüpü içinde hazırlandı. Deney tüplerine ana karışımın pipetle aktarılması sırasındaki kayıplar göz önünde bulundurularak kesim yapılacak örnek sayısından 3-5 örnek kadar fazla olacak şekilde karışım hazırlandı. Tablo 7'de ana karışımın hazırlanışı

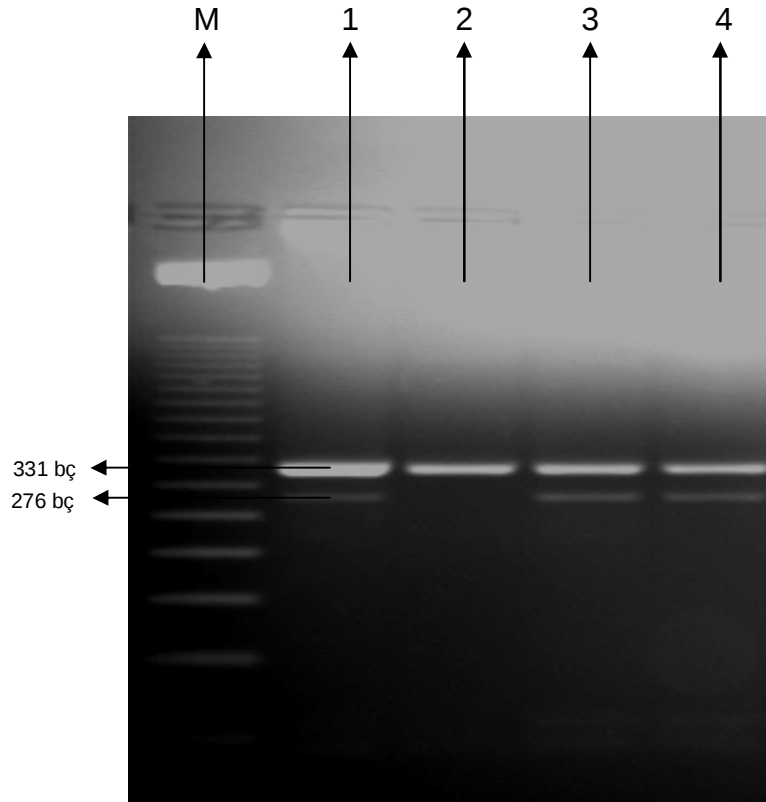
- ve RFLP eriyiklerinden 20 µl'lik bir RFLP reaksiyonu için ne kadar alınması gerektiği ve eriyiklerin reaksiyondaki son konsantrasyonları gösterilmiştir.
2. Tablo 7'de verilen kimyasallar belirtilen miktarlarda karıştırıldı. Öncelikle su, tampon ve BSA sonrasında enzim karışıma eklendi. Ardından vorteks ile karıştırılıp, kısa bir spin santrifüj (8000 devir/dakikada 10 saniye) ile tüm sıvının tüpün alt kısmında toplanması sağlandı.
 3. 0.5 ml'lik steril tüpler PCR ürünleri ile eşleşecek şekilde etiketlenip, içlerine 15 µl RFLP reaksiyon karışımından konuldu.
 4. Tüplere aynı isimli PCR ürünlerinden 5 µl eklendi.
 5. Kısa bir spin santrifüj (8000 devir/dakikada 10 saniye) ile tüm damlacıklar bir araya toplandı ve her tüpün üzerine mineral oil eklendi. Buharlaşmayı önlemek için tüm tüplerin kapak kenarları parafilm ile sıkıca sarıldı. Sonra tüplerin tamamı daha önceden, enzim üreticisinin tavsiyesi doğrultusunda 37 °C'ye ısıtılan kuru ısı bloğuna yerleştirildi.
 6. 37 °C'de bir gece inkübasyonun ardından (16 saat), tüpler kuru ısı bloğundan alınarak 4 °C'de soğumaya bırakıldı. Bu arada yukarıda anlatılan yöntemler ile % 2.5'lik agaroz jel hazırlandı.
 7. Tüm RFLP ürünleri ve DNA marker'ı, tek tek jel yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Yükleme esnasında pipet ile aktarma işlemi çok dikkatli bir şekilde gerçekleştirildi. Jel 90 voltta elektroforez edildi.
 8. 30-45 dakika sonra elektroforez durduruldu. Jel tepsisinden çıkarılan jel, jel görüntüleme sistemi ile incelendi ve bilgisayara bağlı kamera yardımıyla görüntünün fotoğrafı çekildi ve bilgisayara kaydedildi.

Tablo 7. PD-1 +7146 G → A Tek Nükleotid Polimorfizmini Belirlemek İçin RFLP Reaksiyonu Karışımı.

Malzeme	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon (20 µl'de)	Alınan Miktar (µl)
NEBuffer 3	10X	1X	2 µl
Bovin serum albumin	10mg/ml	100µg/ml	0.2 µl
PstI	20.000 U/ml	12 U	0.6 µl
PCR ürünü	--	--	5 µl
ddH ₂ O	--	--	12.2 µl

Kesim reaksiyonu sonucu oluşan ürünler % 2.5'lik agaroz jelde yürütülüp görüntülendikten sonra, olguların genotiplmeleri gerçekleştirildi. Kesim sonucunda elde edilen ve olguların genotipini belirleyen bandlar aşağıda belirtilmiştir. Görüntülü açıklamada Şekil 9'da görülmektedir.

- a- A alleli bulunmayan genotipteki olgularda 331 bç'i büyüklüğündeki tek bir DNA fragmenti (RE tanıma bölgesi bulamadığından PCR ürünü kesilmemiştir) görülmüştür.
- b- Heterozigot genotiplerde 331, 276 ve 55 bç'i büyüklüğünde üç DNA fragmenti (RE bir A allel bulunduğundan dolayı bir tanıma bölgesine sahiptir diğer allele (G) tanıma bölgesi olmadığından kesilmemiştir) görülmüştür.
- c- Homozigot AA genotiplerde 276 ve 55 bç'i büyüklüğünde iki DNA fragmenti (RE iki A alleli bulunduğundan dolayı tüm PCR ürünleri kesmiştir) görülmüştür.



Şekil 9. PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmini RFLP Yöntemi İle Genotiplendirilmesi Sonucu Oluşan DNA Parçalarının % 2.5'luk Agaroz Jeldeki Görüntüsü. M: DNA marker, 1,3,4: PD-1 +7146 G à A heterozigot genotip (331, 276, 55 bç) (GA), 2: PD-1 +7146 G à A homozigot genotip (331 bç) (GG).

3.1.7. PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi

3.1.7.1. PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizminin Saptamak Amacıyla Bu Polimorfizmin Olabileceği DNA Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

PD-1 +7209 C/T tek nükleotid polimorfizmi, PD-1 geninin 4. intronu içerisindeki transisyon şeklinde bir nükleotid değişimidir. Bu transisyon şeklindeki değişim Sitozin'in Timin'e (C/T) dönüşmesi sonucu meydana gelir. PD-1 +7146 G/A Tek Nükleotid Polimorfizminin olup olmadığı Zheng ve ark. (2010)'nın kullanmış oldukları PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. İçerisinde PD-1 +7209 C à Tek nükleotid polimorfizminin bulunduğu 499 baz çiftlik (bç) genomik insan DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu için PD-1 +7209 C à T İleri: 5'- CCC AAG TGT GTT TCT CTG -3' ve PD-1 +7209 C à T Geri: 5'- GCA TTC TTG CAG ATT TAG -3' primerleri kullanılmıştır. National Center for Biotechnology Information (NCBI) nükleotid veri tabanından alınan AF363458 rapor numaralı insan DNA sırası kullanılmış ve primerlerin uygunluğunun testi için online Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) programından yararlanılmıştır. Şekil 10'da kullanılan primerlerin PD-1 geni üzerindeki konumları (altı çizili ve kırmızı renkli nükleotidler) ve +7209 C à T polimorfizminin bulunduğu bölge (mavi renkli nükleotid) gösterilmiştir.

```
tgaccccaag tgtgtttctc tgcagggaca ataggagcca ggcgcaccgg ccagcccctg
gtgagtctca ctcttttcct gcatgatcca ctgtgccttc cttcctgggt gggcagaggt
ggaaggacag gctgggacca cacggcctgc aggactcaca ttctattata gccaggaccc
cacctcccca gccccaggc agcaacctca atccctaaag ccatgatctg gggccccagc
ccacctgcgg tctccggggg tgcccggccc atgtgtgtgc ctgcctgcgg tctccagggg
tgcttgcccc a
(CàT)
gcgtgtgc ccgcctgcgg tctctggggg tgcccggccc acatatgtgc
ctgcctgcgg tctccaggtg tgcccggccc atgcgtgtgc ccacctgcga gggcgtgggg
tgggcttggt catttcttat cttacattgg agacaggaga gcttgaaaag tcacattttg
gaatcctaaa tctgcaagaa tgcagggac atttcagagg gggacattga gccagagagg
```

Şekil 10. PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizminin Bulunduğu Bölgenin Çoğaltılmasında Kullanılan Primerlerin PD-1 Geni Üzerindeki Konumları ve Polimorfizminin Meydana Geldiği Nükleotid

PCR reaktiflerinin hazırlanması ve yapılan işlemler aynen PD-1 +7146 G $\rightarrow$ A polimorfizmi için anlatılan şekliyle yapıldı. Bununla birlikte PD-1 +7209 C $\rightarrow$ T polimorfizmine spesifik primerler kullanıldı. PD-1 +7209 C $\rightarrow$ T polimorfizminin optimum amplifikasyonun gerçekleştirildiği PCR reaksiyon karışımı, PCR sıcaklıkları ve döngü sayısı Tablo 8 ve Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 8. PD-1 +7209 C $\rightarrow$ T Tek Nükleotid Polimorfizmini Saptamak Amacıyla Optimum Amplifikasyonun Gerçekleştirildiği PCR Reaksiyon Karışımı.

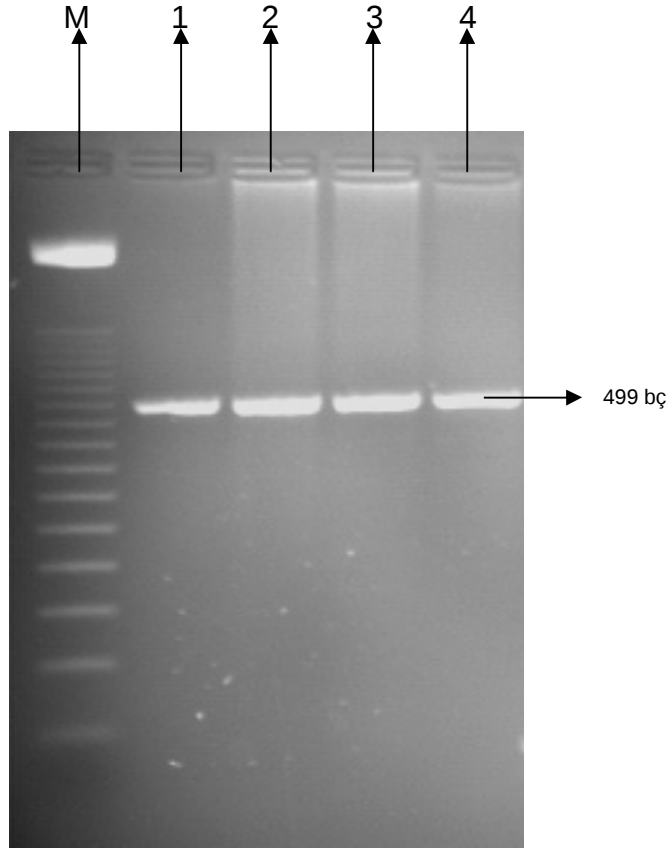
Malzeme	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon (25µl’de)	Alınan Miktar (µl)
PCR tamponu	10X	1X	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1.5 µl
dNTP karışımı	10 mM	200 µM	0.5 µl
PD-1 +7146 G $\rightarrow$ A İleri Primer	50 pmol/µl	12.5 pmol/µl	0.25 µl
PD-1 +7146 G $\rightarrow$ A Geri Primer	50 pmol/µl	12.5 pmol/µl	0.25 µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	3 U	0.6 µl
DNA	15-30 ng/µl	112.5-225 ng	7.5 µl
ddH ₂ O	--	--	11.9 µl

Tablo 9. PD-1 +7209 C $\rightarrow$ T Tek Nükleotid Polimorfizmini İçin PCR Sıcaklıkları ve Döngü Sayıları.

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	3 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	35
Bağlanma (Annealing)	49	30 saniye	
Uzama (Extension)	72	30 saniye	
Son Uzama	72	5 dakika	1
Soğutma	4	--	--

3.1.7.2. PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizmin Bölgesinin PCR İşlemi Sonucunda Görüntülenmesi

PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizmin Bölgesinin PCR reaksiyonu ile çoğaltılması sonucunda bu bölgenin çoğaltılıp çoğaltılamadığı %2.5'luk agaroz jel elektroforez ile kontrol edildi. Birinci kuyucuğa DNA marker diğer kuyulara PCR ürünleri yüklendi. Jel 90 voltta 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. BioDoc IITM Biometra jel görüntüleme sistemi ile DNA bantları incelendi. PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizmin bulunduğu bölge için 499 bp'lık 1 adet bant gözlenir (Şekil 11).



Şekil 11. PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizmin Bölgesinin PCR Reaksiyonu İle Çoğaltılması Sonucu Oluşan DNA Parçasının %2.5'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü. M: DNA marker, 1-4: PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizminin Bulunduğu 499 bp'lık DNA fragmenti.

3.1.7.3. PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizmini Belirlemek İçin RFLP Analizi

PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizmini RFLP yöntemi ile saptayabilmek için BstUI restriksiyon enzimi kullanıldı. Bu enzim 5'...CG[↓]CG...3' sırasına sahip 4 nükleotidlik DNA bölgesini tanır ve küt uç oluşturacak şekilde kesim yapar. Şekil 12'de BstUI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi (altı çizili olan 4 nükleotid) gösterilmiştir. Bu tanıma bölgesi PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizmini bulunduğu nükleotidi de içine almaktadır [çizelgede mavi renk ile gösterilen nükleotidler (+7209 C à T)]. Sitozin'in (C) nükleotidinin bulunması durumunda BstUI restriksiyon enziminin tanıma ve kesim bölgesi tamamlanmış olur ve bu durumda enzim 499 bp'lik DNA parçasını 309 ve 190 bp'lik iki parçaya böler.

GGCCCCAGCC CACCTGCGGT CTCCGGGGGT GCCCGGCCCA TGTGTGTGCC TGCCTGCGGT CTCCAGGGGT GCCTGGCCCA (C à T) GCGTGTGCCC GCCTGCGGTC TCTGGGGGTG CCCGGCCCAC ATATGTGCCT GCCTGCGGTC
--

Şekil 12. BstUI Restriksiyon Enziminin Tanıma Bölgesi ve PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizmini Neden Olan Nükleotid

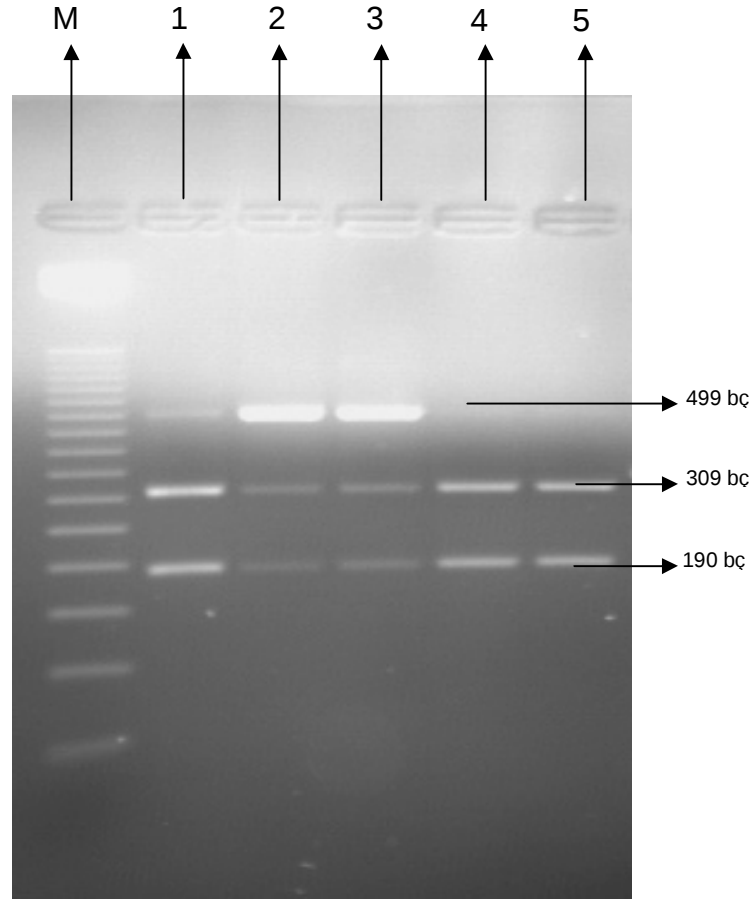
RFLP protokolü PD-1 +7146 G à A Tek Nükleotid Polimorfizmini belirlenmesindeki şekliyle uygulandı. Bununla birlikte PD-1 +7209 C à T mutasyonunun belirlenmesi için BstUI restriksiyon enzimi kullanıldı. Tablo 10'da ana karışımın hazırlanışı ve RFLP eriyiğinden 20 µl'lik bir RFLP reaksiyonu için ne kadar alınması gerektiği ve reaksiyondaki son konsantrasyonları gösterilmiştir.

Tablo 10. PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizminin Belirlenmesi İçin RFLP Reaksiyonu Karışımı.

Malzeme	Stok Konsantrasyon	İstenen Konsantrasyon (20 µl'de)	Alınan Miktar (µl)
NEBuffer 4	10X	1X	2 µl
Bovin serum albumin	10mg/ml	100µg/ml	0.2 µl
BstUI enzimi	10.000 U/ml	12 U	2.4 µl
PCR ürünü	--	--	5 µl
ddH ₂ O	--	--	10.4 µl

Kesim reaksiyonu sonucu oluşan ürünler % 2.5'lik agaroz jelde yürütülüp görüntüledikten sonra, olguların genotiplmeleri gerçekleştirildi. Kesim sonucunda elde edilen ve olguların genotipini belirleyen bandlar aşağıda belirtilmiştir. Görüntülü açıklamada Şekil 13'de görülmektedir.

- a- C alleli bulunmayan genotipteki olgularda 499 bp'i büyüklüğündeki tek bir DNA fragmenti (RE tanıma bölgesi bulamadığından PCR ürünü kesilmemiştir) görülmüştür.
- b- Heterozigot genotiplerde 499, 309, 190 bp'i büyüklüğünde üç DNA fragmenti (RE bir C allel bulunduğundan dolayı bir tanıma bölgesine sahiptir diğer allelde (T) tanıma bölgesi olmadığından kesilmemiştir) görülmüştür.
- c- Homozigot CC genotiplerde 309 ve 190 bp'i büyüklüğünde iki DNA fragmenti (RE iki C alleli bulunduğundan dolayı tüm PCR ürünleri kesmiştir) görülmüştür.



Şekil 13. PD-1 +7209 C à T Tek Nükleotid Polimorfizminin RFLP Yöntemi İle Genotiplendirilmesi Sonucu Oluşan DNA Parçalarının %2.5'lik Agaroz Jeldeki Görüntüsü. M: DNA marker, 1-3 nolu kuyular PD-1 +7209 heterozigot CT genotipli örnekler (499, 309 ve 190 bç), 4-5 nolu kuyular PD-1 +7209 homozigot CC genotipli örnekler (309 ve 190 bç).

3.2. İstatistiksel Analizler

Kronik hepatit B ile spontan HBsAg klirensli grubu arasında sayısal değişkenlerin (yaş) ortalamalarının karşılaştırılmasında Student's *t*-testi, kategorik değişkenlerin (cinsiyet, alkol ve sigara kullanımı gibi) frekansları yönünden farklılıkların karşılaştırılmasında Ki-Kare (χ^2) testi kullanıldı. Kronik hepatit B ile spontan HBsAg klirensli grubu arasında PD-1 +7146 G à A ve PD-1 +7209 C à T polimorfizmlerinin frekansları yönünden farklılıklar χ^2 testi ile kontrol edilir. *p* değerinin 0.05 küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. Bütün istatistiksel yöntemler, "SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 15,0 Chicago, IC, USA)" istatistiksel paket programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya 220 kronik hepatit B hastası ve kontrol grubu olarak 165 spontan HBsAg klirensli sağlıklı birey alındı. Hasta ve kontrol grubu Çukurova Üniversitesi Gastroenteroloji polikliniğine başvuranlar bireyler arasından rastgele seçildi. Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubundaki kişilerin demografik özellikleri tablo 11’de verilmiştir. Çalışmaya alınan hasta grubunun 145’i erkek (% 65,9), 75’i kadın (% 34.1), yaş ortalaması 45.44 ± 13.90 , alkol kullanan 14 (% 6.4), alkol kullanmayan 206 (% 93.6), sigara kullanan 45 (% 27.3) sigara kullanmayan 120 (% 72.7), vücut kitle indeksi 27.21 ± 4.47 idi. Kontrol grubunun ise 82’si kadın (% 49.7), 83’ü erkek (% 50.3), yaş ortalaması 49.99 ± 12.98 , alkol kullanan 10 (% 6.1), alkol kullanmayan 155 (% 93.9), sigara kullanan 68 (% 30.9), sigara kullanmayan 152 (% 69.1), vücut kitle indeksi 27.64 ± 4.27 idi. Hasta grubu ve kontrol grubu; yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, alkol ve sigara kullanımı yönünden karşılaştırıldı. Her iki grupta karşılaştırılan bu parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (P değerleri sırasıyla 0.002, 0.002, 0.90, 0.44, 0.40)(Tablo 11)

Tablo 11. Hasta ve Kontrol Grubu Demografik Verileri.

	Kronik Hepatit B (n=220)	Spontan HBsAg (n=165)	P
Yaş±SD	45.44±13.90	49.99±12.98	0.002
Cinsiyet			0.002
Kadın	75 (% 34.1)	82 (% 49.7)	
Erkek	145 (% 65.9)	83 (% 50.3)	
Alkol			0.90
Kullanıyor	14 (% 6.4)	10 (% 6.1)	
Kullanmıyor	206 (% 93.6)	155 (% 93.9)	
Sigara			0.44
Kullanıyor	45 (% 27.3)	68 (% 30.9)	
Kullanmıyor	120 (% 72.7)	152 (% 69.1)	
Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)	27.21±4.47	27.64±4.27	0.40

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubundaki kişilerin laboratuvar özelliklerinin karşılaştırılması tablo 12’de verilmiştir. Burada ALT, AST, GGT, bilirubin, albumin, PTZ, INR, glukoz, üre, kreatinin, kolesterol, trigliserid, LDL, HDL, lökosit, hemoglobin, hemotokrit, trombosit, ferritin değerleri karşılaştırıldı. Hasta grubu ve kontrol grubunda ALT, AST, GGT, bilirubin, albumin glukoz, üre, kreatinin, ferritin, lökosit, hemoglobin, hemotokrit değerleri iki grub arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmaz iken PTZ, INR, trombosit ve lipid parametreleri açısından hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$) (Tablo 12).

Tablo 12. Hasta ve Kontrol Grubu Laboratuvar Verileri

	Kronik Hepatit B (n=220)	Spontan HBsAg (n=165)	P
ALT±SD (U/L)	44.10±86.63	31.10±25.60	0.078
AST±SD (U/L)	36.38±48.63	28.37±20.75	0.044
GGT±SD (U/L)	30.63±43.94	36.23±61.93	0.351
Total Bilirubin (mg/dL)	0.768±0.617	0.632±0.355	0.031
Direk Bilirubin (mg/dL)	0.22±0.36	0.14±0.13	0.019
Albumin (g/dL)	4.19±0.59	4.31±1.36	0.343
Protrombin zamanı (PTZ)	13.00±1.85	12.25±1.28	<0.001
INR (international normalized ratio)	1.1±0.16	1.01±0.15	<0.001
Glukoz (mg/dL)	100.91±32.62	96.05±26.20	0.157
Üre (mg/dL)	13.77±6.05	14.17±5.75	0.574
Kreatin (mg/dL)	0.95±1.26	0.75±0.21	0.073
Total Kolesterol (mg/dL)	168.60±36.76	195.24±48.14	<0.001
Trigliserid (mg/dL)	119.95±82.72	163.15±103.76	<0.001
LDL (mg/dL)	102.75±32.62	119.97±41.08	<0.001
HDL (mg/dL)	42.01±15.34	44.74±17.14	0.208
AFP (ng/mL)	6.16±15.50	4.01±3.32	0.43
Lökosit(µL)	7.00±2.11	7.40±2.02	0.094
Hemoglobin (g/dL)	13.94±2.80	13.62±2.64	0.309
Hemotokrit (%)	41.04±5.78	39.84±5.58	0.065
Trombosit (µL)	218.03±82.47	261.72±108.68	<0.001
Ferritin (ng/mL)	80.58±111.57	89.28±143.23	0.687

Kronik hepatit B ile enfekte 220 kişi ile spontan HBsAg klirensli 165 kişi arasında PD-1 +7146 G à A polimorfizmi allel frekansı ve genotipler yönünden karşılaştırıldı. Kronik HBV grubunda 386 G alleli (% 87.7), 54 A alleli (% 12.3) saptandı. Spontan HBsAg grubunda ise G alleli 296 (% 89.7), A alleli 34 (% 10.3) idi. Hasta ve kontrol grubu allel frekansı yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p:0.40) (Tablo 13). Hasta ve kontrol grubu genotip açısından karşılaştırıldığında ise hasta grubunda GG genotipi 166 (% 75.5), GA genotipi 54 (% 24.5) iken, kontrol grubunda GG 131 (% 79.4), GA genotipi 34 (% 20.6) saptanmış olup istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p:0.36). (Tablo 13). Ayrıca kontrol ve hasta grubunda dominant ve resesif genotipler karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p:0.36). (Tablo 13)

Tablo 13. Kontrol ve Hasta Grubunda PD-1 Geni +7146 G/A (PD-1.3) rs11568821 Polimorfizminin Allel ve Genotiplerin Karşılaştırılması

	Kronik Hepatit B (%), (n=220)	Spontan HBsAg (n=165)	P değeri	OR (95% CI)
Allel Frekansı				
G	386 (% 87.7)	296 (% 89.7)		1.00 (Referans)
A	54 (% 12.3)	34(% 10.3)	0.40	1.22 (0.77-1.92)
Genel Genotipler				
GG	166 (% 75.5)	131 (% 79.4)		1.00 (Referans)
GA	54 (% 24.5)	34 (% 20.6)	0.36	1.253 (0.771-2.039)
AA	---	--	--	--
Dominant Genotipler				
GG	166 (% 75.5)	131 (% 79.4)		1.00 (Referans)
GA + AA	54 (% 24.5)	34 (% 20.6)	0.36	1.253 (0.771-2.039)
Resesif Genotipler				
GG + GA	220 (% 100)	165 (% 100)		1.00 (Referans)
AA	--	--	--	--

Kronik hepatit B'li 220 hasta ile spontan HBsAg klirensli 165 kontrol grubu PD-1 +7209 C/ T polimorfizmi allel frekansı yönünden karşılaştırıldı. Hasta grubunda C alleli 386 (% 87.7), T alleli 54 (% 12.3) iken, kontrol grubunda ise C alleli 289 (% 87.6), T alleli 41 (% 12.4) idi. Kontrol ve hasta grubunda allel frekansları yönünden karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p:0.95) (Tablo 14).

Hasta ve kontrol grubu genotipler yönünden karşılaştırıldığında ise hasta grubunda CC genotipi 171 (% 77.7), CT genotipi 44 (% 20.0) TT genotipi ise 5 (% 2.3) bulunurken, kontrol grubunda ise CC genotipi 130 (% 78.8), CT genotipi 29 (% 16.6), TT genotipi 6 (% 3.6) olarak saptanmış olup aralarında genotip yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p degerleri CC/CT P:0.591 ve CC/TT P: 0.459) (Tablo 14). Ayrıca hasta ve kontrol grupları dominant ve resesif genotipler yönünden karşılaştırılmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p degerleri; CC/CT+TT P: 0.80, ve CC+CT/TT P: 0.431) (Tablo 14).

Tablo 14. Kronik Hepatit B Grubu ile Spontan HBsAg Klirensli Grubun PD-1 +7209 C/T (rs41386349) Polimorfizminin Allel ve Genotiplerin Karşılaştırılması

	Kronik HBV (%), (n=220)	Spontan HBsAg (%), (n=165)	P değeri	OR (95% CI)
Allel Frekansı				
C	386 (% 87.7)	289 (% 87.6)		1.00 (Referans)
T	54 (% 12.3)	41 (% 12.4)	0.95	0.99 (0.64-1.52)
Genel Genotipler				
CC	171 (% 77.7)	130 (% 78.8)		1.00 (Referans)
CT	44 (% 20.0)	29 (% 16.6)	0.591	1.15 (0.69-1.94)
TT	5 (% 2.3)	6 (% 3.6)	0.459	0.63 (0.19-2.12)
Dominant Genotipler				
CC	171 (% 77.7)	130 (% 78.8)		1.00 (Referans)
CT + TT	49 (% 22.3)	35 (% 21.2)	0.80	1.06 (0.65-1.74)
Resesif Genotipler				
CC + CT	215 (% 97.7)	159 (% 96.4)		1.00 (Referans)
TT	5 (% 2.3)	64 (% 3.6)	0.431	0.62 (0.185-2.10)

Kronik hepatit B grubu ile spontan HBsAg klirensli gruptaki kadın ve erkeklerde alt grub analizi yapılarak; +7146 G/A (PD-1.3) polimorfizmi, allel frekansı ve genotipler yönünden karşılaştırıldı. Hasta grubu 145 erkekten oluşmaktaydı. Bu grupta G alleli 250 (% 86.2), A alleli 40 (% 13.8) idi. HBsAg klirensli olan grupta ise 83 erkek bulunmakta olup G alleli 152 (% 91.6) A alleli 14 (% 8.4) saptanırken istatistiksel açıdan iki gruptaki erkekler arasında allel sıklığı yönünden anlamlı bir fark saptanamadı (P:0,09). Genotip yönünden ise GG genotipi 105 (% 72.4), GA genotipi 40 (% 27.6), AA genotipi ise saptanmadı. Spontan klirensli grupta, GG genotipi 69 (% 83.1) GA 14 (% 16.9) idi. AA genotipi ise saptanmadı. Kontrol ve hasta grubundaki erkekler genotip yönünden karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı (p: 0.07)(tablo 15)

Hasta grubunda 75, kontrol grubunda ise 82 kadın vardı. Hasta grubunda G aleli 136 (% 90.7), A aleli 14 (% 9.3) iken kontrol grubunda G aleli 144 (% 87.8), A aleli 20 (% 12.2) idi. İki gruptaki kadınlar arasında allel sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı (P:0,42). Genotip yönünden hasta grubundaki kadınlarda GG genotipi 61 (% 81.3), GA genotipi 14 (% 18.7) iken. AA genotipi ise saptanmadı. Kontrol grubunda ise kadınlarda GG genotipi 62 (% 75.6), GA 20 (% 24.4) iken AA genotipi ise saptanmadı. Kontrol ve hasta grubundaki kadınlarda genotip yönünden karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (P: 0.38) (tablo 15).

Tablo 15. Kronik Hepatit B Grubu ile Spontan HBsAg Klirensli Grubtaki Kadın ve Erkeklerde PD-1 +7146 G/A (PD-1.3) Polimorfizminin Allel ve Genotip Sıklığının Karşılaştırılması

Cinsiyet	Allel/Genotip	N _{Kronik Hepatit B} (%)	N _{Spontan HBsAg} (%)	P değeri	OR (95% CI)
Erkek		145	83		
	G	250 (% 86.2)	152 (% 91.6)		1.00 (Referans)
	A	40 (% 13.8)	14 (% 8.4)	0.09	1.74 (0.92-3.30)
	GG	105 (% 72.4)	69 (% 83.1)		1.00 (Referans)
	GA	40 (% 27.6)	14 (% 16.9)	0.07	1.88 (0.95-3.71)
	AA	---	--	--	--
Kadın		75	82		
	G	136 (% 90.7)	144 (% 87.8)		1.00 (Referans)
	A	14 (% 9.3)	20 (% 12.2)	0.42	0.74 (0.36-1.53)
	GG	61 (% 81.3)	62 (% 75.6)		1.00 (Referans)
	GA	14 (% 18.7)	20 (% 24.4)	0.38	0.71 (0.33-1.54)
	AA	---	--	--	--

Kronik hepatit B grubu ve spontan HBsAg klirensli grupta erkeklerde +7209 C/T polimorfizm, allel frekansı ve genotipler yönünden alt grub analizleri yapıldı. Hasta grubunda 145 erkek olup, C aleli 252 (% 86.9), T aleli 38 (% 13.1) saptanırken. kontrol grubunda ise 83 erkek mevcut olup, C aleli 148 (% 89.2), T aleli 18 (% 10.8) olarak saptanmıştır. Kontrol ve hasta grubunda erkekler allel frekansı yönünden

karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (P:0,48).Hasta grubu erkeklerinde genotip olarak; CC genotipi 110 (% 75.8), CT genotipi 32 (% 22.1), TT genotipi 3 (% 2.1) iken kontrol grubunda CC genotipi 68 (% 81.9), CT genotip 12 (% 14.5), TT genotipi 3 (% 3.6) olarak saptanmıştır. Kontrol ve hasta grubundaki erkekler genotip yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p değerleri; CC/CT p:0.18, CC/TT p:0.56) (Tablo 16).

Kontrol ve hasta grubunda kadınlar allel frekansı yönünden karşılaştırıldı. Hasta grubunda 75 kadın olup, C alleli 134 (% 89.3) T alleli 16 (% 10.7) iken, kontrol grubunda ise 82 kadın olup, C alleli 141 (% 86.0), T alleli 23 (% 14.0) olarak saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubu kadınlarda allel frekansı yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (P:0,37). Hasta ve kontrol grubu kadınlarda genotipler yönünden hasta grubunda CC genotipi 61 (% 81.3), CT genotipi 12 (% 16.0), TT genotipi 2 (% 2.7) iken kontrol grubunda, CC genotipi 62 (% 75.6), CT genotipi 17 (% 20.6) TT genotipi 3 (% 3.7) olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu kadınlarda genotipler yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (CC/CT P:0,43, CC/TT P:0,68) (Tablo 16)

Tablo 16. Kronik hepatit B Grubu ve Spontan HBsAg Klirensli Grubtaki Kadın ve Erkeklerin PD-1 +7209 C/T Polimorfizmi Allel ve Genotip Sıklığı Yönünden Karşılaştırılması

Cinsiyet	Allel/Genotip	N _{Kronik Hepatit B} (%)	N _{Spontan HBsAg} (%)	P değeri	OR (95% CI)
Erkek		145	83		
	C	252 (% 86.9)	148 (% 89.2)		1.00 (Referans)
	T	38 (% 13.1)	18 (% 10.8)	0.48	1.24 (0.68-2.25)
	CC	110 (% 75.8)	68 (% 81.9)		1.00 (Referans)
	CT	32 (% 22.1)	12 (% 14.5)	0.18	1.64 (0.80-3.42)
	TT	3 (% 2.1)	3 (% 3.6)	0.56	0.62 (0.12-3.15)
Kadın		75	82		
	C	134 (% 89.3)	141 (% 86.0)		1.00 (Referans)
	T	16 (% 10.7)	23 (% 14.0)	0.37	0.73 (0.37-1.45)
	CC	61 (% 81.3)	62 (% 75.6)		1.00 (Referans)
	CT	12 (% 16.0)	17 (% 20.6)	0.42	0.72 (0.32-1.63)
	TT	2 (% 2.7)	3 (% 3.7)	0,68	0,68 (0,11-4,2)

5. TARTIŞMA

Hepatit B virüs infeksiyonu, inaktif kronik hepatit B'ye ya da karaciğer hastalığına ilerleyerek kronik aktif hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomaya neden olabilmektedir. HBV infeksiyonunun iyileşmesi veya kronikleşmesini belirlemede çevresel ve konağa ait faktörler etkili olmakla birlikte adaptif immünite merkezi bir role sahiptir. Kronik hepatit B infeksiyonlu kişilerde periferik kan ve karaciğerdeki T hücreleri fonksiyonel bozukluğa uğramaktadır. T hücreleri ve antijen sunucu hücrelerden eksprese olan pozitif ve negatif kositümülatör moleküllerin T hücre yanıtında belirleyici olduğu bilinmektedir. Birçok kositümülatör molekül arasında PD-1 ve PD-1 ligandları immün yanıtın düzenlemesi ve ayarlamasında önemli bir yolağı oluşturmaktadır⁽¹⁶¹⁾.

PD-1, ilk defa Ishida ve ark. tarafından 1992 yılında tanımlanmıştır ve PD-1-PD-L1 yolağının uyarıcı ve inhibitör sinyaller arasındaki dengeyi düzenleyerek mikroplara karşı etkili immün yanıt ve self-toleransın korunmasında rol oynadığını ileri sürmüşlerdir⁽¹⁶²⁾.

Otoimmünite fare modeli çalışmalarında PD-1 ve ligandlarının immün düzenleyici rolünün önemli olduğu ve nonobese diabetik (NOD) farelerdeki çalışmada PD-1 ve PD-L1'in inhibisyonunun hızlı ve daha da kötüleşen diyabete neden olduğu ve çok daha fazla CD4⁺, CD8⁺ T hücrelerinin IFN- γ ve tümör nekroz faktör sentezlediği gösterilmiştir⁽¹²⁵⁾.

Buna zıt olarak Amerika'dan Narasimhan ve ark.nın HIV'li hastalarda yaptıkları çalışmada yaşlanmış virüse spesifik CD8⁺ ve CD4⁺ hücrelerinin kronik viral infeksiyonda aşırı PD-1 molekülleri eksprese etmelerine rağmen bu moleküllerin down regülasyonu sonucu infekte hücrelerin apoptoza karşı direnç göstermekte olduğunu bildirmişlerdir. Virüse spesifik T hücre yanıtını etkileyen PD-1-PD-L1 kositümülatör yolağının apoptozun başlatılmasında temel mekanizma olabileceğini düşünmektedirler⁽¹²⁴⁾

Sistemik lupus eritematosiz (SLE), tip 1 diyabet (tip1 DM), romatoid artrit(RA) ve multipıl sklerozis(MS) gibi birkaç otoimmün hastalığın patogenezinin PD-1

polimorfizmin ile ilişkili olduğu ve bu polimorfizmin önemli bir fonksiyonunun olduğu gösterilmiştir⁽¹³³⁻¹⁴²⁾

PD-1 polimorfizmin İsveç’li, Avrupa-Amerikalı ve Meksikalı hastalarda SLE’nin gelişmesiyle ilişkili olduğu, Danimarkalı hastalarda tip 1 DM riskini, romatoid faktörü negatif olan Avrupalı hastalarda romatoid artriti ve Alman hastalarda da multipl sklerozisi artırdığı bildirilmiştir^(135,137). PD-1 aracılığı ile IFN- γ üretiminin durdurulmasının G7146A polimorfizmine sahip multipl sklerozisli Alman hastalarda engellendiği bildirilmiştir⁽¹³³⁾ İspanya’dan yapılan bir çalışmada ise PD-1’in SLE hastalığına yatkınlık ile ilişkisi bulunduğu halde polimorfizm ile ilişkisi olmadığı bildirilmiştir.⁽¹⁴³⁾

G7146A dışındaki PD-1 geni intronundaki diğer polimorfizmlerin Çin popülasyonunda RA ile ilişkili olduğu fakat SLE ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir^(136,141). Ayrıca Tayvan’da SLE, Kore popülasyonunda ankilozan spondilit ve atopik insanlarda çim allerjenlerine spesifik IgE yanıtı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir Bu polimorfizmlerin çoğunun genin intronundaki korunmuş bölgede olduğu bulunmuştur⁽¹⁴⁴⁾

Chun ve ark. kawasaki hastalığının PD-1 geninin farklı bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmleri (rs41386349 (PD-1 +7209) ve rs2227981) ile genetik yatkınlık ilişkisini araştırmışlardır. 73 kawasaki hastası ve 100 sağlıklı kontrol grubu alınarak yapılan çalışmada rs41386349’nolu polimorfizmde T allel sıklığı kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (P:0,007). Diğer polimorfizm olan rs2227981’de ise anlamlı bir fark saptanmamıştır (P:0,4)⁽¹⁶³⁾. Ayrıca PD-L1, meme kanseri, serviks kanseri, gastrik karsinom, özafagus kanseri, larinks kanseri gibi kanser türlerinin doku ve hücrelerinden aşırı ekspresyona uğradığı bildirilmiştir. Bunun sonucu olarak tümör hücrelerinin immün sistemce algılanması baskılanmakta ve tümörün ilerleyişine neden olmaktadır.

İran’dan yapılan bir çalışmada Haghshenas ve ark.’ları tarafından PD-1 +7146 G/A polimorfizmi 443 meme kanserli kadın hasta grubu ile 328 sağlıklı kontrol grubunda allel ve genotip yönünden karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Allel sıklığı P:0,279, Genotip sıklığı P:0,252)⁽¹⁶⁴⁾.

Changping ve ark. PD-1’nin gastrik karsinom, adenom ve normal dokudaki düzeyleri ile gastrik karsinom prognozu arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışmaya

102 gastrik karsinom, 10 adenom ve 10 normal doku örneği alınmıştır. Normal gastrik dokuda PD-L1 saptanmaz iken gastrik adenomda çok az miktarda ve gastrik karsinomlu dokuda % 42,2 olarak bulunmuştur. PD-L1 immünolokalizasyonu ile yaş, cinsiyet, tümör yerleşimi ve gastrik karsinom diferansasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunmamasına karşın, tümör çapı, invazyon, lenf nodu metastazı ve yaşam süresi ile PD-L1 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (P değerleri sırası ile 0,037, 0,03, 0,002, 0,001). PD-L1'in gastrik karsinom prognozunu değerlendirmede bağımsız bir faktör olarak kullanılabileceği belirtilmektedir⁽¹⁶⁵⁾.

Çin'den Shi ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada hepatosellüler karsinomlu 56 hasta, sirozlu 20 hasta ve 20 sağlıklı kontrol grubu alınarak periferde sirküle olan ve tümör içindeki PD-1/PD-L1'in ekspresyonu analiz edilerek hastalığın ilerleyişi ile ilişkisi araştırılmıştır. Sirküle olan ve tümör içi PD-1⁺CD8⁺T hücrelerinin sıklığı sağlıklı kontrol grubuna göre hasta gruplarında arttığı bildirilmiştir (P:0,008 ve P:0,001). Sirküle ve tümör içinde PD-1 ekspresyonunun artmasının hastalığın ilerlemesinde ve postoperatif nükste etkili olduğu ileri sürülmüştür⁽¹⁶⁶⁾.

Çin'den yapılan diğer bir çalışmada Wu ve ark. 71 HSK'li hasta grubunda tümörlü doku ve bu dokuyu saran çevre dokuda PD-1⁺CD8⁺T hücrelerinin ekspresyon analizini yapmışlardır. Yaptıkları analiz sonucu tümörlü dokuda normal dokuya göre PD-1⁺CD8⁺T hücrelerinin daha çok eksprese olduğu bulunmuştur (P<0,05). B7-H1/PD-1 yolağının karaciğer kanserinde immün baskılayıcı olduğu ve bu yolağın inhibisyonunun tedavide önemli bir yol olabileceğini belirtmişlerdir⁽¹⁶⁷⁾.

Liu XY ve ark. 60 HBV'li akut karaciğer yetmezlikli hastada PD-1 ekspresyonunun CD8⁺T hücrelerinde daha az sentezlendiğini fakat diğer dokuların CD8⁺T hücrelerinde daha fazla eksprese olduğunu bulmuşlardır⁽¹⁶⁸⁾.

Teng XY ve ark. 19 immün tolerans fazda ve 25 immün klirens fazda bulunan HBV'li hastalarda PD-1/PD-L1 ekspresyon düzeyini incelemişlerdir. İnceleme sonucunda immün tolerans fazda, immün klirens fazına göre PD-1/PD-L1 ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (P<0,05)⁽¹⁶⁹⁾.

Çin'den Feng Lv ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada 539 kronik HBV'li hasta grubu ile bu hastaların sağlıklı aile bireylerinden oluşturulan kontrol grubunda PD-1.1 ve PD-1.2 polimorfizmlerinin sıklığı ve aralarındaki ilişki araştırılmıştır.

Çalışma sonunda kronik HBV enfeksiyonu ile belirtilen polimorfizmlerin arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunamamıştır (P:0,0688)⁽¹⁷⁰⁾.

Çin’de Zhang ve ark.’nın yaptığı çalışmada kronik hepatit B’li 198 hasta (31’i inaktif taşıyıcı, 92’si kronik HBV, 55’i HBV’ye bağlı siroz, 20’si HBV’ye bağlı HSK) ve 280 kişilik kontrol grubunda PD-1.1 (-606G/A) ve +8669G/A(PD-1.6) tek nükleotid polimorfizmlerinin sıklıkları ve bu hastalıkla ilişkisi değerlendirilmiştir.

PD-1.1 genotipleri sıklık yönünden kontrol ve HBV hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamasına karşın (p değerleri>0,05) PD-1.6 genotiplerinde sıklık yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (p değerleri<0,05). PD-1.1 allel sıklığında hasta ve kontrol grubu arasında önemli bir fark saptanmamış (G/A p:0,612) fakat PD-1.6 G alleli kontrol grubuna göre hastalarda daha az sıklıkta görülmüş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0,006). Yapılan alt grup analizde sirozlularda PD-1.6 G alleli daha az sıklıkta bulunmuş olup hastalığın ilerlemesinde rol oynayabileceği belirtilmektedir⁽¹⁷¹⁾.

İngiltere’den Evans ve ark.’nın yaptığı çalışmada kronik hepatit B’li 18 hastada (HBeAg+ kronik hepatit B lamivudine veya telvübidine antiviral tedavisi alan) PD-1 ekspresyonu düzeyi, viral yük, HBeAg serokonversiyonu ve T hücre reaktivasyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır. Hastalarda antiviral tedavi öncesi ve sonrası değerler kıyaslanarak tedavi nedeniyle HBV replikasyonu baskılandığında T hücrelerinde PD-1 ekspresyonu ve transkripsiyonunun önemli oranda azaldığı gösterilmiştir. Böylece T hücre fonksiyonu ve aktivasyonu üzerindeki negatif inhibitör etkide azalma olduğu ortaya konulmuştur. Viral yük ve HBeAg pozitifliğinin devam etmesi durumunda ise PD-1 ekspresyonu devam etmekte ve bunun sonucu olarak T hücrelerinin fonksiyonel bozukluğuna neden olarak immün toleransı sağladığı belirtilmektedir⁽¹⁷²⁾.

Çin’de Zheng ve ark.’nın yaptığı çalışmada kronik hepatit B’li 502 hasta ve 359 sağlıklı kontrol grubu arasında PD-1 genotip sıklığı, genotip sıklığının HBV viral yük ve kronik enfeksiyon riski ile ilişkisi araştırılmıştır. PD-1 +7209 C **à** T polimorfizminin; kronik enfeksiyon riski yönünden allel ve genotip sıklığı ile ilişkili olmadığı fakat düşük viral yük ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Allel ile ilişkisi P:0,009 T/C, Genotip sıklığı ilişkisi P:0,005 TT/CC)⁽¹⁷³⁾.

Biz çalışmamızda kronik hepatit B’li hasta grubu ve spontan HBsAg klirensli kontrol grubunda PD-1 geni üzerinde bulunan G7146A ve T7209C tek nükleotid

polimorfizmlerinin viral klirens etkisini araştırdık. Kronik hepatit B ile spontan HBsAg klirensli grubu arasında PD-1 +7146 G/A polimorfizmi allel frekansı ve genotipler yönünden karşılaştırıldı. Hasta ve kontrol grubu allel frekansı yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p:0.40). Hasta ve kontrol grubu genotip açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p:0.36) (Tablo3). Çalıştığımız hasta ve kontrol grubunda AA genotipi hiç saptanmadı.

Kronik hepatit B grubu ile spontan HBsAg klirensli gruptaki kadın ve erkeklerde alt grub analizi yapılarak; +7146 G/A (PD-1.3) polimorfizmi, allel frekansı ve genotipler yönünden karşılaştırıldı. Kontrol ve hasta grubundaki erkekler allel frekansı yönünden karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (P:0,09). Kontrol ve hasta grubundaki erkekler genotip yönünden karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p: 0.07)(tablo 5).

Hasta ve kontrol grubundaki kadınlar arasında allel ve genotip sıklığı yönünden karşılaştırıldı. İki gruptaki kadınlar arasında allel sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı (P:0,42). Kontrol ve hasta grubundaki kadınlar genotip yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (P: 0.38) (tablo 5).

Bizim sonuçlarımızla uyumlu, farklı hastalıklar ile bu polimorfizm arasındaki ilişki araştırılmış olup; İsveç'ten Asad ve ark.'nın PD-1 +7146 polimorfizmi ile tip 1 diyabet arasında ilişki bulamamışlardır ⁽⁸⁾. Ayrıca İran'dan Haghshenas ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada PD-1 +7146 G/A polimorfizmi ile meme kanseri arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır⁽¹⁶⁴⁾. Buna zıt olarak Kroner ve ark.'nın yaptığı çalışmada G7146A polimorfizmine sahip multipl sklerozisli Alman hastalarda PD-1 aracılığı ile IFN- γ üretiminin durdurulmasının engellendiğı ve bu polimorfizim ile anlamlı bir ilişki olduğı saptanmıştır⁽¹³⁴⁾.

Çalışmış olduğumuz diğerk PD-1 +7209 C/T polimorfizmi kronik hepatit B ile spontan HBsAg klirensli kontrol grubu arasında allel frekansı yönünden karşılaştırıldı. Kontrol ve hasta grubu arasında allel frekansları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p:0.95) (Tablo 14).

Hasta ve kontrol grubu genotipler yönünden karşılaştırıldığında ise aralarında genotip yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p degerleri CC/CT

P:0.591 ve CC/TT P: 0.459) (Tablo 4). Ayrıca hasta ve kontrol grupları dominant ve resesif genotipler yönünden karşılaştırılmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p değerleri; CC/CT+TT P: 0.80 ve CC+CT/TT P: 0.431) (Tablo4).

Çin'den Zheng ve ark.'nın kronik HBV'li ve kontrol grubunda yaptığı çalışma sonucunda iki grup arasında PD-1 +7209 C/T polimorfizmi yönünden anlamlı bir fark saptanmamıştır⁽¹⁷³⁾. Bu sonuç bizim bulgularımızı desteklemektedir. Buna zıt olarak Güney Kore'den Chun ve ark.'nın kawasaki hastalığında yaptıkları çalışmada PD-1 +7209 polimorfizmi ile kawasaki hastalığı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bulmuşlardır⁽¹⁶³⁾.

Kronik hepatit B grubu ve spontan HBsAg klirensli kontrol grubunda erkeklerde +7209 C/T polimorfizmi, allel ve genotip frekansı yönünden alt grub analizleri yapıldı. Kontrol ve hasta grubundaki erkekler arasında allel sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (P:0,48). Kontrol ve hasta grubundaki erkekler genotip yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p değeleri; CC/CT p:0.18, CC/TT p:0.56)(Tablo 6)

Kontrol ve hasta grubunda kadınlar allel frekansı yönünden karşılaştırıldı. Hasta ve kontrol grubu kadınlarda allel frekansı yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (P:0,37). Hasta ve kontrol grubu kadınlarda genotipler yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (CC/CT P:0,38, CC/TT P:0,4)

Ayrıca yaptığımız iki grup arasındaki kan parametreleri karşılaştırılmasında PTZ, İNR, trombosit ve total kolesterol, trigliserid, LDL yönünden karşılaştırılan iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanırken (P:0,001), HDL, ALT, AST, GGT, bilirubin, albumin, glukoz, üre, kreatin, lökosit, hemoglobin, hematokrit, ferritin değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (P>0,05).

Tayvan'dan Su ve ark.'nın asemptomatik kronik HBV'li hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında yaptıkları karşılaştırmada HBV'li hastalarda serum trigliserid ve HDL kolestrol düzeyini daha düşük bulmuşlardır⁽¹⁷⁴⁾. Ayrıca Tayvandan yapılan diğer bir çalışmada Chen ve ark. kronik hepatit B ve C'li hastalarda kan plazma trigliserid ve kolestrol seviyelerini daha düşük olduğunu bulmuşlardır⁽¹⁷⁵⁾. Çin'den yapılan diğer bir çalışmada Zhengming ve ark. Kronik HBV'li hastalarda kolestrol seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğunu bulmuşlardır⁽¹⁷⁶⁾. Bu bulgular ile bizim

sonuçlarımız paralel yönde olup sonuç olarak HBV enfeksiyonu ile serum kolesterol ve trigliserid düzeyleri arasında zıt bir ilişki olduğunu ileri sürebiliriz. Bu ilişkinin sebebinin fibrozis kaynaklı olup olmadığını belirlemek için fibrozis derecesi ile serum kolesterol ve trigliserid düzeyi arasında yapmış olduğumuz çoklu karşılaştırma testinde (ANOVA) herhangi bir anlamlı istatistiksel ilişki saptanmamıştır ($P>0,05$).

Ayrıca yaptığımız iki grup arasındaki trombosit değerlerinin karşılaştırılmasında HBV'li grupta trombosit değerlerinin daha düşük olduğu bulunmuştur ($P<0,05$). Bunun en yaygın nedeninin yapılan çalışmalarda hipersplenizm olduğu gösterilmiştir⁽¹⁷⁷⁾. Bir diğer nedeninin ise artmış fibrozis derecesi olduğu bildirilmiştir⁽¹⁷⁸⁾. Bu ilişkinin sebebinin fibrozis kaynaklı olup olmadığını belirlemek için kronik HBV'li grupta fibrozis derecesi ile trombosit sayıları arasında yaptığımız çoklu karşılaştırma testinde (ANOVA) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($P:0,015$). Bu farklılığın çalışma grubumuzdaki kronik hepatit B'li hastalardan fibrozis derecesi 1 olanlar ile fibrozis derecesi 4 olanlar arasında olduğunu çoklu karşılaştırma testi ile belirledik ($P:0,01$). Bu sonuca dayanarak artan fibrozisin trombositopeniye neden olduğunu ileri sürebiliriz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ağırlıklı olarak Akdeniz, Güneydoğu ve İç Anadolu bölgesindeki bireylerden oluşan bu çalışmada kronik HBV'li grubu ile spontan HBsAg klirensli kontrol grubu arasında PD-1 geni üzerinde bulunan G7146A ve T7209C tek nükleotid polimorfizimleri yönünden herhangi bir istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($P>0,05$). Bu sonuca dayanarak çalışılan popülasyonunda hepatit B'nin kronikleşmesi ile PD-1 +7146 ve +7209 polimorfizmlerinin bir ilişkisinin olmadığını ileri sürebiliriz. Fakat kronik HBV'li hasta grubu ile spontan HBsAg klirensli kontrol grubundaki bireylerin sayısının yetersiz olması anlamsız bir ilişkiye neden olmuş olabilir. Yapmış olduğumuz alt grubu analizde de kadınlar ve erkekler arasında bu polimorfizmin HBV'nin kronikleşmesi ile ilişkisinin olmadığını bununla birlikte alt grubu analizde de hasta ve kontrol grubu sayısının daha da azalması çalışmamızın gücünü sınırlandırmıştır. Bu ilişkilerin daha doğru değerlendirilmesi için daha fazla sayıda hasta ve kontrol grubu içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yapılan birçok farklı çalışmada PD-1-PDL-1 ekspresyonunun birçok hastalıkla ilişkili olduğu bulunmuşken PD-1 +7146 ve +7209 polimorfizmlerinin HBV ilişkisi konusunda farklı sonuçlar ileri sürülmüştür. Gözlenen farklılıkların sebebinin farklı popülasyonlardaki popülasyon genetiği ile açıklanabilmektedir.

Yapılan çalışmalarda PD-1'in periferik CD8⁺ T hücre toleransında önemli olduğu ve bu yolağın self-reaktif T hücre yanıtının inhibisyonunda inhibitör sinyallerini tetikleyerek otoimmün hastalıkların iyileştirilmesinde yararlı bir strateji olabileceği önerilmektedir.

PD-1/PDL-1 yolağının inhibe edilmesinin viral replikasyonun immün kontrolü için bir yaklaşım olarak sunulmasına rağmen bunun immünopatolojik ve otoimmünitenin zararlı etkilerine neden olabileceği de düşünülmektedir.

Çalışmamızda kronik HBV'li grupta kolestrol düzeylerinin daha düşük olduğunu tespit ettik. Bunun nedeninin karaciğerin kolestrol sentez mekanizmasının fibroze ve inflamasyona bağlı olarak bozulmuş olabileceğini düşünerek yaptığımız analizde

fibrozis ile kolesterol ve trigliserid düzeyleri arasında istatistiksel bir ilişkinin olmadığını saptadık. Bu konunun tam olarak anlaşılması için daha geniş çalışma gruplarında analizlerin yapılması ve değerlendirilmesi gerektiğini ileri sürebiliriz.

Kronik HBV'li grupta trombosit miktarlarının artan fibrozis ile ters orantılı olarak azaldığını belirledik. HBV'ye bağlı trombositopeninin önlenmesi için fibrozisin daha erken saptanması ve tedavi başlanması düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. **Lavanchy D.** Hepatitis B epidemiology, disease burden treatment and emerging prevention and control measures. *J Viral hepat* **2004**; 11(2):97-107.
2. **Liang TJ.** Hepatitis B: The virus and disease. *Hepatology*. **2009**; 49(5 suppl):S13-21
3. **Okazaki T, Honjo T.** The PD-1 –PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* **2006**; 27:195-201
4. **Greenwald RJ, Freeman GJ, Share AH.** The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.*, **2005**; 23:515-48
5. **Chen L.** Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T – Cell immunity. *Nat Rev Immunol*. **2004**; 4:336-347.
6. **Guleria I. et al.** A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J. Exp. Med*. **2005**; 202: 231–237.
7. **Lu F, Gao YF, Zhang ZH et al.** Polymorphisms in programmed death-1 gene are not associated with chronic HBV infection in Chinese patients. *World J Hepatol*. **2011**; 27; 3(3):72-8.
8. **Asad S, Nikamo P, Torn C et al.** No evidence of association of the PDCD1 gene with Type 1 diabetes. *Diabet Med*. **2007**; 24(12):1473-7.
9. **Zheng L, Li D, Wang F et al.** Association between hepatitis B viral burden in chronic infection and a functional single nucleotide polymorphism of the PDCD1 gene. *J Clin Immunol*. **2010**; 30(6):855-60.
10. **McMahon BJ.** Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis*. **2005**; 25(Suppl1):3-8
11. **Mast EE, Alter MJ, Margolis HS.** Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine*. **1999**; 17(13-14):1730-3.
12. **Weinbaum CM, Williams I, Mast EE, et al.** Recommendations for identification and public health management of person with chronic hepatitis B virus infection. *MMWR Recomm Rep* **2008**; 57:1-20
13. **Bielawski KP, Stalke P.** Molecular epidemiology of chronic hepatitis B virus infection in northern Poland. *J Clin Virol* **2005**; 34 (supp (1)):63-9.
14. **Gish RG, Locarnini S.** Chronic hepatitis B Viral Infection, in Yamada T(ed):*Textbook of Gastroenterology*, Blackwell Publishing Ltd.Oxford, UK.(**2009**)
15. **Beasley RP, Hwang LY, Lee GC et al.** Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. *Lancet*. **1983**; 2(8359):1099-102.
16. **Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, et al.** Incidence of hepatitis B virus infections in preschool children in Taiwan. *J Infect Dis* **1982**; 146(2):198-204.

17. **Coursaget P, Yvonnet B, Chotard J et al.** Age- and sex-related study of hepatitis B virus chronic carrier state in infants from an endemic area (Senegal). *J Med Virol* **1987**; 22(1):1-5.
18. **McMahon BJ, Alward WL, Hall DB et al.** Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis* **1985**; 151(4):599-603.
19. **Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Sjogren MH, Roumeliotou-Karayannis A, Gerin JL, Purcell RH.** Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults. *Gastroenterology* **1987**; 92(6):1844-1850.
20. **Mistik R.** Ülkemizde kronik viral hepatitlerin epidemiyolojisi. *Klimik Dergisi*; **2007**;20 (özel sayı 1):61-3.
21. **Tözün N, Özdoğan OC, Çakaloğlu Y, İdilman R, Karasu Z, Akarca US, Kaymakoglu S, Ergönül Ö.** A nationwide prevalence study and risk factors for hepatitis A, B, C and D infections in Turkey. *The 61st Annual meeting of the American Association for the study of liver diseases. (AASLD) Oct29-Nov2 2010, Boston.*(Poster presentation, No. 789)
22. **Karaaslan H, Yurdaydin C.** Viral hepatitis at the Black Sea region: the problem of viral hepatitis in Turkey revisited. *Turk J Gastroenterol.* **2009**; 20: 1-2.
23. **Chang MH, Hsu HY, Hsu HC, Ni YH, Chen JS, Chen DS.** The significance of spontaneous hepatitis e antigen seroconversion in childhood: with special emphasis on the clearance of hepatitis e antigen before 3 years of age. *Hepatology* **1995**; 22:1387-92
24. **Chu CM, Karayiannis P, Fowler MJ, Monjardino J, Liaw YF, Thomas HC.** Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: studies of hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology.* **1985**; 5:431-434.
25. **Hsu HY, Chang MH, Hsieh KH, et al.** Cellular immune response to HBcAg in mother-to – infant transmission of hepatitis B virus. *Hepatology.***1992**; 15:770-776
26. **Chen M, Sallberg M, Hughes J, et al.** Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol.* **2005**; 79:3016-3027.
27. **Chang MH, Hwang LY, Hsu HC, Lee CY, Beasley RP.** Prospective study of asymptomatic HBsAg carrier children infected in the perinatal period: clinical and liver histologic studies. *Hepatology* **1988**; 8:374-377
28. **Lok AS, Lai CL.** A longitudinal follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive Chinese children. *Hepatology.* **1988**; 8:1130-1133.
29. **McMahon BJ, Holck P, Buldkow L, Snowball M.** Serologic and clinical outcomes of 1536 Alaska Natives chronically infected with hepatitis B virus. *Ann Intern Med.* **2001**; 135:759
30. **Liaw YF, Chu CM, Su IJ, Huang MJ, Lin DY, Chang-chien CS.** Clinical and histological events preceding hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis. *Gastroenterology.* **1983**; 84:216-219.
31. **Liaw YF, Pao CC, Chu CM, Sheen IS, Huang MJ.** Changes of serum hepatitis B virus DNA in two types of clinical events preceding spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis. *Hepatology.* **1987**; 7:1-3.
32. **Lok AS, Lai CL.** Alpha-fetoprotein monitoring in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection: Role in the early detection of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **1989**; 9:110-115.

33. **Liaw YF, Tsai SL.** Patogenesis and clinical significance of spontaneous exacerbations and remissions in chronic HBV infection. *Viral hepatitis Rev.* **1997**; 143-54
34. **Yuen MF, Yuan HJ, Hui CK, et al.** Large population study of spontaneous HBeAg seroconversion and acute exacerbation of chronic hepatitis B infection: implications for antiviral therapy. *Gut.* **2003**; 52:416-419.
35. **Pan CQ, Zhang JX.** Natural history and clinical consequences of hepatitis B virus infection. *International journal of Medical Sciences* **2005**; 2:36-40.
36. **Ocana S, Casas ML, Buhigas I et al.** Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* **2011**; 28:17(12):1553-7.
37. **McMahon BJ.** Natural history of chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis.* **2010**; 14(3):381-96.
38. **Liaw YF.** Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. *Liver Int.* **2009**; 29 Suppl 1:100-7.
39. **Kao JH, WuNH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS.** Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* **2000**; 33(6):998-1002.
40. **Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS.** HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* **2002**; 36 (6) : 1425-1430.
41. **Erhardt A, Blondin D, Hauck K, et al.** Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* **2005**; 54 (7):1009-1013.
42. **Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, et al.** Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* **2005**; 365(9454):123-129
43. **Hsu Y, Chien RN, Yeh CT, et al.** Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* **2002**; 35. 1522-1527.
44. **Fattovich G, Oliveri N, Pasino M, Donofrio M, Martone E, Donato F.** Long-term outcome of chronic hepatitis B in Caucasian patients: mortality after 25 years. *Gut* **2008**; 57:84-90.
45. **Chu CM, Hung SJ, Lin j, Tai DI, Laiw YF.** Natural history of hepatitis B e antigen to antibody seroconversion in patients with normal aminotranferase levels. *Am J Med.* **2004**; 116:829-834
46. **Yang HI, Lu SN, Liaw YF et al.** Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* **2002**; 347:168-174.
47. **Lai CL, Yuen MF.** The natural history of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* **2007**; 14. Suppl 1:6-10
48. **Fattovich G, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW, Christensen E.** Effect of hepatitis B and C virus infections on the natural history of compensated cirrhosis: a cohort study of 297 patients. *Am J Gastroenterol* **2002**; 97: 2886-2895.
49. **Park BK, Park YN, Ahn SH et al.** Long -term outcome of chronic hepatitis B based on histological grade and stage. *J Gastroenterol Hepatolol.* **2007**; 22:383-388.
50. **Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y et al.** Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patient with chronic viral hepatitis: a prospective observation in 2215 patients. *J Hepatol.* **1998**; 28:930-938

51. **Liaw YF, Farrell G, Sung JJ et al.** Disease progression in chronic hepatitis B with advanced fibrosis or cirrhosis. *J Hepatol.* **2005**; (Suppl).
52. **Chen CJ, Yang HI, Su J et al.** REVEAL-HBV Study Group Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* **2006**; 295:65-73.
53. **Iloeje UH, Yang HI, Su J, et al.** Risk Evaluation of viral load Elevation and Associated Liver Disease/Cancer-in HBV(the REVEAL-HBV)Study Group. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* **2006**; 130:678-686
54. **Chen G, Lin w, Sheen F, Iloeje UH, London WT.** Morbidity from HSK and chronic Liver disease in prospective study. *Am J Gastroenterol.* **2006**; 101:1797-1803.
55. **Donato F, Boffetta P, Puoti M.** Meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int Cancer* **1988**; 75:347-354.
56. **Shi J, Zhu L, Liu S, Xie WF.** A Meta-analysis of case-control studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China. *Br J Cancer* **2005**; 92:607-612
57. **Liaw YF, Chen YC, Sheen IS, Chien RN, Yeh CT, Chu CM.** Impact of acute hepatitis C virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* **2004**; 126:1024-1029.
58. **Fattovich G, Boscaro S, Noventa F et al.** Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis B. *J Infect Dis.* **1987**; 155:931-935.
59. **Tamura I, Kurimura O, Koda T et al.** Risk of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in subjects with hepatitis B and delta virus infection: a study from Kure, Japan. *J Gastroenterol Hepatol* **1993**; 8:433-436.
60. **Raimondo G, Brunetto MR, Pontisso P et al.** Longitudinal evaluation reveals a complex spectrum of virological profiles in hepatitis B / hepatitis C virus coinfecting patients. *Hepatology* **2006**; 43:100-1007.
61. **Puoti M, Torti C, Bruno R, Filice G, Carosi G.** Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients. *J Hepatol.* **2006**; 44:S65-S70.
62. **Thio C, Seaberg E, Skolasky R et al.** HIV-1, hepatitis B virus and the risk of liver-related mortality in the MACS. *Lancet* **2002**; 360:1921-1926.
63. **Huang YT, Yang HI, Jen CI et al.** Suppression of hepatitis B virus replication by hepatitis C: Combined effects on risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2005**; 42 suppl 1:230A
64. **Donato F, Tagger A, Chiesa R et al.** Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking and hepatocellular carcinoma: A case-control study in Italy. *Hepatology* **1997**; 26:579.
65. **Huo TI, Wu JC, Hwang SJ et al.** Factors predictive of liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B: a multivariate analysis in longitudinal study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* . **2000**; 12:687-693.
66. **El-Serag HB, Hampel H, Javadi F.** The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* . **2006**; 4:369-380.

67. **Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB.** Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United states: a population based case control study. *Gut* **2005**; 54:533-539.
68. **Martinelli AL, Filho AB, Franco RF et al.** Liver iron deposits in hepatitis B patients: association with severity of liver disease but not with hemochromatosis gene mutations. *J Gastroenterol Hepatol.* **2004**; 19:1036-41.
69. **Ghaziani T, Alavian SM, Zali MR et al.** Serum measures of iron status and HFE gene mutations in patients with hepatitis B virus infection. *Hepatol Res.* **2007**; 37:172-8.
70. **Fujita N, Sugimoto R, Ma N et al.** Comparison of hepatic oxidative DNA damage in patients with chronic hepatitis B and C. *J Viral hepat.* **2008**; 15(7):498-507
71. **Gordon A, Mclean CA, Pederson JS, Bailey MJ, Roberts SK.** Hepatic steatosis in chronic hepatitis B and C: predictors, distribution and effect on fibrosis. *J Hepatol.* **2005**; 43:38-44.
72. **Thomopoulos KC, Arvaniti V, Tsamantas AC et al.** Prevalence of liver steatosis in patients with chronic hepatitis B: a study of associated factors and of relationship with fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **2006**; 18(3):233-7.
73. **Bondini S, Kallman J, Wheeler A et al.** Impact of non-alcoholic fatty liver disease on chronic hepatitis B. *Liver Int* **2007**; 607-611.
74. **Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Manesis EK, Chrysanthos N, Kafiri G, Archimandritis AJ.** Hepatic steatosis in chronic hepatitis B develops due to host metabolic factors: a comparative approach with genotype 1 chronic hepatitis C. *Dig Liv Dis* **2007**; 39:936-942.
75. **Brunetto MR, Oliveri F, Coco B, et al.** Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. *J Hepatol* **2002**; 36 :263-270
76. **Liaw YF, Tai DI, Chu CM, Chen TJ.** The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Hepatology.* **1988**; 8:493-496.
77. **Yu MW, Hsu FC, Sheen IS et al.** Prospective study of hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis in asymptomatic chronic hepatitis B virus carriers. *Am J Epidemiol.* **1997**; 145:1039-1047.
78. **Moreno-Otero R, Garcia-Monzon C, Garcia-Sanchez A, Garcia BL, Pajares JM, Di Bisceglie AM.** Development of cirrhosis after chronic type B hepatitis: a clinico-pathologic and follow-up study of 46 HBeAg-positive asymptomatic patients. *Am J Gastroenterol* **1991**; 86:560-564.
79. **Fattovich G, Stroffolini T, Zargani I, Donato F.** Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* **2004**; 127:S35-S50.
80. **Shimizu I.** Impact of oestrogens on the progression of liver disease. *Liver Int* **2003**; 23:63-69
81. **Donato F, Gelatti U, Limina RM, Fattovich G.** Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: A systematic review of the epidemiologic evidence. *Oncogene* **2006**; 25:3756-3770.
82. **Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y et al.** Interferon decreases hepatocellular carcinogenesis in patients with cirrhosis caused by the hepatitis B virus. *Cancer* **1998**; 82:827-835.
83. **Yu MW, Chang HC, Liaw YF et al.** Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst* **2000**; 92:1159-1164

84. **Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH et al.** Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology* **2002**; 36:1214-1220.
85. **Xiao F, Wei H, Song S, Li G, Song C.** Polymorphism in the promoter region of angiotensinogen gene are associated with liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* **2006**; 21:1488-1491.
86. **Lok AS, McMahon BJ.** Chronic hepatitis B. *Hepatology* **2009**; 50:661-2
87. **Keeffe EB, Dieterich DT, Hans SH et al.** A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an update. *Clin Gastroenterol Hepatol*. **2006**; 4:936-962.
88. **European Association For The Study Of The Liver.** Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol*. **2009**; 50(2):227-42. EASL
89. **Piratvisuth T.** Reviews for APASL guidelines: immunomodulator therapy of chronic hepatitis B. *Hepatol Int*. **2008**; 2(2):140-6.
90. **Lok AS, Lai CL, Leung N, Yao GB, Cui ZY, Schiffrer et al.** Long term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B *Gastroenterology*. **2003**; 125:1714-1722.
91. **Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Chang TT, Heathcote J, Kitis G, Rizzetto M et al.** Long term therapy with adefovir dipivoxil treatment induces regression of liver fibrosis in patients with HBeAg negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. **2005**; 352:2673-81
92. **Colonna R, Rose R, Pokornowski K et al.** Four year assessment of ETV resistance in nucleoside naive and lamivudine refractory patients. *J Hepatol* **2007**; 46:S294
93. **Sheldon J, Camino N, Rodes B et al.** Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV coinfecting patients treated with tenofovir. *Antivir Ther* **2005**; 10:727-34.
94. **Seeger C, Mason WS.** Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Bio Rev* **2000**; 64(1):51-68
95. **Bruss V.** Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* **2004**; 106(2):199-209.
96. **Locarnini S.** Molecular virology of Hepatitis B Virus. *Semin Liver Dis* **2004**; 24(1):3-10
97. **Ferrari C, Misale G, Boni C, Urbani S.** EASL International Consensus Conference on hepatitis B: Immunopathogenesis of Hepatitis B. *Journal of Hepatology* **2003**; 39:1-7
98. **Chen MT, Billaud JN, Sallberg M, Guidotti LG, Chisari FV, Jones J, Hughes J, Milich DR.** A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**; 101:14913
99. **Ganem D, Schneider R.** Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: *Lippincott-Raven*; **2001**; 2923-2970
100. **Greenwald RJ, Freeman GJ, Share AH.** The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* **2005**; 23:515-48
101. **Okazaki T, Honjo T.** The PD-1 –PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* **2006**; 27:195-201
102. **Chen L.** Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T – Cell immunity. *Nat Rev Immunol* **2004**; 4:336-347.

103. **Parry RV et al.** CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell Biol.* **2005**; 25:9543-9553.
104. **Freeman G.J. et al.** Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **2000**; 192:1027–1034.
105. **Dong H, Zhu G, Tamada, K& Chen L.** B7-H1 a third member of the B7 family, costimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* **1999**; 5:1365–1369.
106. **Tseng SY et al.** B7-DC a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* **2001**; 193: 839–846.
107. **Nakae S et al.** Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J. Immunol.* **2006**; 176:2238-48.
108. **Latchman Y et al.** PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat immunol.* **2001**; 2:261-68.
109. **Augello A et al.** Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immuno* **2005**; 35:1482-90.
110. **Brown JA et al.** Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol.* **2003**; 170:1257-66.
111. **Rodig N et al.** Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8⁺ cell activation and cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **2003**; 33:3117-26.
112. **Eppihimer MJ et al.** Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cell. *Microcirculation.* **2002**; 9:133-145.
113. **Muhlbauer M et al.** PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and interferon –alpha and gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol.* **2006**; 45:520-528.
114. **Selenko-Gebauer N et al.** B7-H1(programmed death-1 ligand) on dendritic cell is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *J. Immunol.* **2003**; 170:3637-3644.
115. **Liang S.C. et al.** Regulation of PD-1 PD-L1 and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur. J. Immunol* **2003**; 33: 2706–2716.
116. **Nishimura H, Honjo T& Minato N.** Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. *J. Exp. Med.* **2000**; 191:891–898.
117. **Keir ME, Latchman YE, Freeman GJ & Sharpe AH.** Programmed death-1(PD- 1):PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes. *J.Immunol* **2005**; 175: 7372–7379.
118. **Blank C et al.** Absence of programmed death receptor 1 alters thymic development and enhances generation of CD4/CD8 double-negative TCR-transgenic T cells. *J. Immunol.* **2003**; 171: 4574–4581 .
119. **Sabapatha A, Gercel-Taylor C & Taylor DD.** Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am. J. Reprod. Immunol* **2006**; 56:345–355.
120. **Holets LM, Hunt JS & Petroff MG.** Trophoblast CD274 (B7-H1) is differentially expressed across gestation: influence of oxygen concentration. *Biol. Reprod.* **2006**; 74:352–358.

121. **Guleria I et al.** A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J. Exp. Med.* **2005**; 202: 231–237.
122. **Hori J. et al.** B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *J. Immunol* **2006**; 177: 5928–5935.
123. **Meng Q et al.** CD4+PD-1+ T cells acting as regulatory cells during the induction of anterior chamber-associated immune deviation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**; 47:4444–4452.
124. **Watson MP, George AJ & Larkin DF.** Differential effects of costimulatory pathway modulation on corneal allograft survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**; 47: 3417–3422.
125. **Wang J. et al.** Establishment of NOD-Pdcd1/mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**; 102:11823–11828.
126. **Keir ME et al.** Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med* **2006**; 203: 883–895.
127. **Isogawa M, Furuichi Y & Chisari FV.** Oscillating CD8+ T cell effector functions after antigen recognition in the liver. *Immunity* **2005**; 23: 53–63.
128. **Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T & Honjo T.** PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J. Exp. Med* **2003**; 198: 39–50.
129. **Kaech SM, Wherry EJ & Ahmed R.** Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol* **2002**; 2: 251–262.
130. **Wherry EJ, Blattman JN & Ahmed R.** Low CD8 T-cell proliferative potential and high viral load limit the effectiveness of therapeutic vaccination. *J. Virol* **2005**; 79:8960–8968.
131. **Wherry EJ & Ahmed R.** Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* **2004**; 78:5535–5545.
132. **Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Van der Most R & Ahmed R.** Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol* **2003**; 77: 4911–4927.
133. **Klenerman P & Hill A.** T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat. Immunol* **2005**; 6:873–879.
134. **Kroner A et al.** A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann. Neurol* **2005**; 58:50–57.
135. **Nielsen C et al.** A putative regulatory polymorphism in PD-1 is associated with nephropathy in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* **2004**; 13:510–516.
136. **Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB & Lillevang ST.** Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens* **2003**; 62: 492–497.
137. **Kong EK et al.** A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis Rheum.* **2005**; 52:1058–1062.
138. **Prokunina L et al.** A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat. Genet.* **2002**; 32: 666–669.
139. **Lin SC et al.** Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis but not systemic lupus erythematosus arthritis. *Rheum.* **2004**; 50:770–775.

140. **Johansson M, Arlestig L, Moller B & Rantapaa-Dahlqvist S.** Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **2005**; 52:1665–1669.
141. **Prokunina L. et al.** Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis Rheum.* **2004**; 50:1770–1773.
142. **Wang SC et al.** Programmed death-1 gene polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus in taiwan. *J. Clin. Immunol.* **2006**; 26: 506–511.
143. **Lee SH. et al.** Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. *Arthritis Res. Ther.* **2006**; 8:R163.
144. **Ferreiros-Vidal I et al.** Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence of population-specific effects. *Arthritis Rheum.* **2004**; 50:2590–2597.
145. **James ES. et al.** PDCD1: a tissue-specific susceptibility locus for inherited inflammatory disorders. *Genes Immun.* **2005**; 6:430–437.
146. **Zerbini A, Pilli M, Boni C. et al.** The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* **2008**; 134: 1470-1481
147. **Radziejewicz H, Uebelhoer L, Bengsch B, Grakoui A.** Memory CD8+ T cell differentiation in viral infection: a cell for all seasons. *World J Gastroenterol* **2007**; 13: 4848-4857.
148. **Menne S, Tennant BC.** Unraveling hepatitis B virus infection of mice and men (and woodchucks and ducks) *NatMed* **1999**; 5: 1125-1126.
149. **Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV.** The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* **1996**; 2:1104-1108.
150. **Khoury SJ, Sayegh MH.** The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity* **2004**; 20: 529-538
151. **Nurieva R, Thomas S, Nguyen T et al.** T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J* **2006**; 25: 2623-2633.
152. **Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C et al.** PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and-gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* **2006**; 45:520-528.
153. **Bowen DG, Shoukry NH, Grakoui A et al.** Variable patterns of programmed death-1 expression on fully functional memory T cells after spontaneous resolution of hepatitis C virus infection. *J Virol* **2008**; 82: 5109-5114.
154. **Zhang Z, Zhang JY, Wherry EJ et al.** Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8 T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B. *Gastroenterology* **2008**; 134: 1938-1949,1949.e1-e3
155. **Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P et al.** PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **2006**; 443: 350-354
156. **Latchman YE, Liang SC, Wu Y et al.** PDL1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigenpresenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**; 101: 10691- 10696.

157. **Okazaki T, Honjo T.** The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* **2006**; 27: 195-201.
158. **Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM et al.** PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* **2006**; 203: 2281-2292.
159. **Venkatachari NJ, Buchanan WG, Ayyavoo V.** Human immunodeficiency virus (HIV 1) infection selectively downregulates PD-1 expression in infected cells and protects the cells from early apoptosis in vitro and in vivo. *Virology* **2008**; 376: 140-153.
160. **Meier A, Bagchi A, Sidhu HK et al.** Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands. *AIDS* **2008**; 22: 655-658.
161. **Barber DL, Wherry EJ, Masopust D et al.** Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **2006**; 439: 682-687.
162. **Okazaki T, Honjo T** PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application *Int Immunol.* **2007**; 19(7):813-24.
163. **Chun JK, Kang DW, Yoo BW, Eur J et al.** Programmed death-1 (PD-1) gene polymorphisms lodged in the genetic predispositions of Kawasaki Disease. *Pediatr.* **2010** ; 169(2):181-5.
164. **Haghshenas MR, Naeimi S, Talei A et al.** Program death 1 (PD1) haplotyping in patients with breast carcinoma. *Mol Biol Rep.* **2011**; 38(6):4205-10.
165. **Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J et al.** Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem.* **2006**; 108(1):19-24.
166. **Shi F, Shi M, Zeng Z et al.** PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer.* **2011**; 15; 128 (4) :887-96.
167. **Wu K, Kryczek I, Chen L et al.** Kupffer cell suppression of CD8+ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions. *Cancer Res.* **2009**; 15;69(20):8067-75
168. **Liu XY, Shi F, Zhao H, Wang HF.** Research of PD-1 expression in CD8+ T cell of peripheral blood with HBV-associated acute-on-chronic liver failure. *Chienese journal of experimental and clinical virology* **2010**; 24(2):125-7.
169. **Teng XY, Wang P, Zhou XG et al.** PD-1/PD-L1 expressions in liver tissues of patients with chronic HBV infection. *Chienese journal of hepatology* **2011**; 19(5):345-8.
170. **Lu F, Gao YF, Zhang ZH et al.** Polymorphisms in programmed death-1 gene are not associated with chronic HBV infection in Chinese patients. *World J Hepatol.* **2011**; 27;3(3):72-8
171. **Zhang G, Liu Z, Duan S et al.** Association of polymorphisms of programmed cell death-1 gene with chronic hepatitis B virus infection. *Hum Immunol.* **2010**; 71(12):1209-13.
172. **Evans A, Riva A, Cooksley H et al.** Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B: Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion. *Hepatology.* **2008**; 48 (3):759-69.
173. **Zheng L, Li D, Wang F et al.** Association between hepatitis B viral burden in chronic infection and a functional single nucleotide polymorphism of the PDCD1 gene. *J Clin Immunol.* **2010**; 30(6):855-60

174. **Su TC, Lee YT, Cheng TJ et al.** Chronic hepatitis B virus infection and dyslipidemia. *J Formos Med Assoc.* **2004**; 103(4):286-91.
175. **Chen JY, Wang JH, Lin CY et al.** Lower prevalence of hypercholesterolemia and hyperglyceridemia found in subjects with seropositivity for both hepatitis B and C strains independently. *J Gastroenterol Hepatol.* **2010**; 25(11):1763-8.
176. **Chen Z, Keech A, Collins R et al.** Prolonged infection with hepatitis B virus and association between low blood cholesterol concentration and liver cancer. *BMJ.* **1993**; 306(6882):890-4.
177. **Behnava B, Alavian SM, Ahmadzad Asl M.** The Prevalence of Thrombocytopenia in Patients with Chronic Hepatitis B and C. *Hepatitis Montlily* **2006**; 6(2):67-69
178. **Karasu Z, Tekin F, Ersoz G et al.** Liver fibrosis is associated with decreased peripheral platelet count in patients with chronic hepatitis B and C. *Dig Dis Sci.* **2007**; 52(6):1535-9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Yakup ÜLGER
Doğum Tarihi ve Yeri :01.01.1973 Kadirli / Osmaniye
Medeni Durumu :Evli
Adres :Toros mah.Kebude Apt. Kat:10 No:20
Çukurova ADANA

Telefon :05064379957

E-mail :Yakup73us@yahoo.com

Mezun Olduğu Tıp Fakültesi :İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Görev Yeri :Çukurova Üniversitesi

Yabancı Dili : İngilizce