

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KRONİK HEPATİT B'Lİ HASTALARDA
SERUM NEOPTERİN DÜZEYLERİNİN KARACİĞER
NEKROENFLAMASYONU İLE KORELASYONU**

Dr. Gülhan ÇALLI SAMSA

**UZMANLIK TEZİ
2013**

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**KRONİK HEPATİT B'Lİ HASTALARDA
SERUM NEOPTERİN DÜZEYLERİNİN KARACİĞER
NEKROENFLAMASYONU İLE KORELASYONU**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Gülhan ÇALLI SAMSA

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ziya KURUÜZÜM

Bu uzmanlık tezi DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2013.KB. SAG.044 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER:

ÖZET	I
SUMMARY	III
TABLO DİZİNİ	V
ŞEKİL DİZİNİ.....	VII
TEŞEKKÜR.....	VIII
KISALTMALAR	IX
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 NEOPTERİN.....	3
2.1.1 Tarihçe	3
2.1.2 Neopterinin Kimyasal Yapısı.....	3
2.1.3 Neopterin Biyosentezi.....	4
2.1.4 Neopterinin Fizyolojik Rolü	5
2.1.5 Neopterinin Klinik Önemi	5
2.1.6 Neopterin Ölçme Yöntemleri ve Vücut Sıvılarında Neopterin Düzeyleri ..	6
2.1.7 Serumda Neopterin	7
2.1.8 Neopterin ve Otoimmün Hastalıklar	7
2.1.9 Neopterin ve Diğer Hastalıklar	7
2.1.10 Neopterin ve Enfeksiyon Hastalıkları	7
2.1.10.1 Bakteriyel Enfeksiyonlar ve Neopterin	8
2.1.10.2 Viral Enfeksiyonlar ve Neopterin.....	8
2.1.10.3 Paraziter Enfeksiyonlar ve Neopterin	10

2.2 HEPATİT B VİRUSU.....	10
2.2.1 Giriş	10
2.2.2.Virolojik Özellikler.....	10
2.2.3 Epidemiyoloji ve Bulaş	11
2.2.4 Dünyada HBV Enfeksiyonu	12
2.2.5 Patogenez.....	13
2.2.6 Klinik Özellikler.....	15
2.2.7 HBV Enfeksiyonunda Tanı Yöntemleri	16
2.2.7.1 Serolojik Tanı	16
2.2.7.2 Moleküler Tanı	17
2.2.7.3 Histopatolojik Tanı-Karaciğer Biyopsisi.....	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
4. BULGULAR.....	28
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
7. KAYNAKLAR	45

ÖZET

KRONİK HEPATİT B'Lİ HASTALARDA SERUM NEOPTERİN DÜZEYLERİ İLE KARACİĞER NEKROENFLAMASYONUNUN KORELÂSYONU

Dr. Gülhan ÇALLI SAMSA

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ziya KURUÜZÜM

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik
Mikrobiyoloji AD, 35340, İnciraltı, İzmir**

Amaç: Gama interferon stimülasyonuna yanıt olarak insan makrofaj ve monositlerinden sekrete edilen bir sitokin olan neopterinin, kronik hepatit B enfeksiyonunda karaciğerde nekroenflamasyon ve fibrozis derecesini gösteren bir belirteç olduğunun gösterilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 04 Ocak 2013 - 01 Ekim 2013 tarihleri arasında hastanemizin Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı polikliniği ve İç Hastalıkları AD Gastroenteroloji Dalı polikliniğine başvuran, kronik hepatit B tanı kriterlerine uyan, takip ile tedavi kararı açısından başvuru tarihinden önceki son 1 yıl içinde ve başvuru sonrasında karaciğer biyopsisi yapılmış ancak tedavi almamış gönüllü ve 18 yaşından büyük hastalar dahil edildi. Hastalardan alınan serum örneklerinde neopterin düzeyleri ELISA yöntemi ile araştırıldı ve bulunan sonuçlar, karaciğer biyopsisi ile saptanan HAI ve fibrozis skoru ile korele edildi.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 64 hastada serum neopterin düzeyleri, yaş, cinsiyet, serum ALT düzeyi ve serum HBV DNA düzeyi arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p= 0.07$, $p=0.329$, $p=0.101$, $p=0.134$). Hastalarda serum neopterin düzeyleri ile HAI ve fibrozis skorları arasında pozitif korelasyon ve istatistiksel anlamlılık saptandı ($p<0.001$, $p=0.001$). Hastaların 16' sında (%25) HBeAg pozitif, 48'inde (%75) HBeAg negatif saptanırken, hem HBeAg pozitif hem HBeAg negatif hasta grubunda serum neopterin düzeyleri ile HAI ve fibrozis skoru arasında pozitif korelasyon olduğu gösterildi ($p=0.009$, $p=0.034$, $p=0.002$, $p=0.011$).

Sonuç ve Öneriler: Kronik hepatit B enfeksiyonunda nekroenflamasyon ve fibrozis gelişimine T lenfositler ve makrofajların rol aldığı immun yanıt yol açmaktadır. Bu immun yanıt sırasında makrofajlardan salgılanan neopterinin karaciğerdeki nekroenflamasyon ve fibrozis varlığı ve derecesini yansıttığı düşünülmektedir. Serum neopterin düzeyi ile karaciğer biyopsisi ile saptanan HAI ve fibrozis skoru arasında pozitif korelasyonun ve istatistiksel anlamlı bir ilişkinin olduğu gösterilmiş olup, neopterinin karaciğerdeki nekroenflamasyon ve fibrozis derecesini göstermede umut vaadeden bir belirteç olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Neopterin, nekroenflamasyon, fibrozis, hepatit B.

SUMMARY

CORRELATION OF SERUM NEOPTERIN LEVELS AND LIVER NECROINFLAMMATION IN CHRONIC HEPATITIS B PATIENTS

Dr. Gülhan ÇALLI SAMSA

**Dokuz Eylül University School of Medicine, Department of Infections
Diseases and Clinical Microbiology, İzmir, Turkey**

Aim: Neopterin is a cytokine that is secreted in response to gamma interferon stimulation of human macrophages and monocytes. It's aimed to determine that neopterin is a marker indicating necroinflammation and fibrosis levels in chronic hepatitis B infection.

Materials and Methods: From January 4 to October 1, 2013 in Infections Diseases and Clinical Microbiology outpatient clinic and Gastroenterology outpatient clinic of our hospital, untreated, ≥ 18 years old volunteers that fulfilled criteria for diagnosis of chronic hepatitis B, had undergone liver biopsy in the last 1 year preceding the date of application and after application, were included. Neopterin levels in serum samples were investigated by ELISA. Results were correlated by HAI and fibrosis scores determined by liver biopsy.

Results: In the 64 patients included in the study, relationship between serum neopterin levels and age, sex, serum ALT and serum HBV DNA levels were not statistically significant ($p= 0.07$, $p=0.329$, $p=0.101$, $p=0.134$). Positive correlation between serum neopterin levels, HAI and fibrosis scores was found statistically significant ($p<0.001$, $p=0.001$). Sixteen (%25) HBeAg (+) and 48 (%75) HBeAg (-) patients were detected. Both HBeAg positive and HBeAg negative patient group, serum neopterin levels correlated positively with HAI and fibrosis scores ($p=0.009$, $p=0.034$, $p=0.002$, $p=0.011$).

Conclusion: T lymphocytes and macrophages leads to development of necroinflammation and fibrosis in chronic hepatitis B. During immune response, neopterin released from macrophages is thought to reflect the necroinflammation

and fibrosis in liver. Positive correlation and statistically significant relationship between serum neopterin levels, HAI and fibrosis scores were shown. Therefore neopterin is admitted to be a promising marker of fibrosis and necroinflammation in chronic hepatitis B infection.

Key Words: Neopterin, necroinflammation, fibrosis, hepatitis B

TABLO DİZİNİ:

Tablo 1: Modifiye Histolojik Aktivite İndeksi	s.19
Tablo 2: NSB, Standart solüsyonları, Kontroller ve Serum Örneklerinin Kuyucuklara Yerleşimi	s.25
Tablo 3: Fotometre ile Ölçülen Kontrol-1, Kontrol-2 ve Hasta Serumlarının Absorbans ve Serum Neopterin Düzeyleri	s.27
Tablo 4: Kontrol Solüsyonlarının Fotometrik Ölçümlerinin Referans Aralıkları	s.27
Tablo 5: Yaş gruplarına göre ortalama serum neopterin düzeylerinin dağılımı	s.28
Tablo 6: Cinsiyete göre ortalama serum neopterin düzeyleri	s.28
Tablo 7: HAI skoruna göre hasta sayısı ve ortalama serum neopterin düzeylerinin dağılımı	s.29
Tablo 8: HAI gruplarına göre hasta sayısı ve ortalama serum neopterin düzeylerinin dağılımı	s.30
Tablo 9: Fibrozis skoruna göre hasta sayısının ve ortalama serum neopterin düzeylerinin dağılımı	s.31
Tablo 10: Fibrozis skoru gruplarına göre hasta sayısı ve ortalama serum neopterin düzeylerinin dağılımı	s.31
Tablo 11: HBeAg serolojisine göre hastaların cinsiyet ve yaş dağılımı	s.32
Tablo 12: HBeAg pozitif ve negatif hastaların karşılaştırılması	s.33
Tablo 13: HBeAg pozitif hastalarda fibrozis skoruna göre hasta sayısı ve serum neopterin düzeylerinin dağılımı	s.33
Tablo 14: HBeAg pozitif hastalarda HAI skoruna göre hasta sayısı ve serum neopterin düzeylerinin dağılımı	s.34
Tablo 15: HBeAg negatif hastalarda fibrozis skoruna göre hasta sayısı ve serum neopterin düzeylerinin dağılımı	s.35

Tablo 16: HBeAg negatif hastalarda HAI skoruna göre hasta sayısı ve serum neopterin düzeylerinin dağılımı **s.36**

SEKİL DİZİNİ:

Şekil 1: Neopterin Biosentezi

s.4

TESEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca sundukları bilimsel, destekleyici ve verimli ortam için başta anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Ayşe YÜCE'ye, değerli hocalarım Prof. Dr. Nedim ÇAKIR, Prof. Dr. Nur YAPAR, Prof. Dr. Vildan Avkan OĞUZ, Doç. Dr. Ziya KURUÜZÜM, Yrd. Doç. Dr. Sema Alp ÇAVUŞ ve Uzm. Dr. Oya Özlem EREN KUTSOYLU'ya çok teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Uzm. Dr. Kübra DEMİR ÖNDER, Dr. Vecihe DURSUN, Dr. Hatice KÖSE, Dr. Hande HAZIR KONYA, Dr. Madina ABDULLAYEVA ve Dr. Muammer ÇELİK'e, kliniğimiz hemşire ve çalışanlarına;

Tezimin laboratuvar çalışmalarında bana gösterdikleri destek ve sevecenlik için DEÜTF Merkez Laboratuvarı Seroloji Birimi'ndeki teknisyen dostlarıma;

Zorlu eğitim ve meslek yaşantımda bana gösterdikleri sevgi, destek ve anlayış ile her zaman yanımda olan canım annem Yurdağül ÇALLI ve babam Erdal ÇALLI ile sevgili eşim Uzm.Dr.Murat SAMSA'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

Dr. Gülhan ÇALLI SAMSA

KISALTMALAR:

NP: Neopterin

IFN: İnterferon

HBV: Hepatit B Virüs

DNA: Deoksiribonükleik Asit

HSK: Hepatosellüler karsinom

HCV: Hepatit C Virüs

RNA: Ribonükleik asit

KHB: Kronik hepatit B

GTP: Guanozin Trifosfat

NK: Natural killer

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TH: T-helper

HIV: Human Immunodeficiency Virüs

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

RIA: Radio Immun Assay

ELISA: Enzym Linked Immunosorbant Assay

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CMV: Sitomegalovirus

EBV: Epstein-Barr virus

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

KİYS: Kazanılmış İmmun Yetmezlik Sendromu

IL: İnterlökin

HBsAg: Hepatit B virüs yüzey antijeni

HBcAg: Hepatit B core Antijen

HBeAg: Hepatit B virüs e Antijeni

STH: Sitotoksik T Hücresi

ALT: Alanin Amino Transferaz

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

HAI: Histolojik Aktivite İndeksi

1.GİRİŞ VE AMAÇ:

Neopterin (NP), gama interferon (IFN- γ) stimülasyonuna yanıt olarak insan makrofaj ve monositlerinden sekrete edilen pteridin türevi bir maddedir. Neopterin, sadece T-Helper 1 (TH 1) aracılı hücrel immun sistemin bir göstergesi değil, konak savunma reaksiyonlarında da fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları olan bir sitokindir (1). Neopterin, patojenlere karşı vücutta oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin sitotoksik etkilerini arttırarak savunmada önemli rol oynamaktadır. İmmun yanıt sonucu başta idrar ve serum olmak üzere birçok vücut sıvısında NP düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Farklı vücut sıvılarındaki NP konsantrasyonun belirlenmesi ve T lenfosit ile makrofajların rol aldığı birçok hastalığın tanısının konabileceği gösterilmiştir. Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada NP üretiminin hücrel immun aktivasyonla ilişkisi kanıtlanmış olup, serum NP düzeyleri ile enfeksiyöz ve enflamatuvar hastalıkların şiddeti ve progresyonu arasında güçlü bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (2).

Hepatit B virüsü (HBV), Hepadnaviridae ailesinden Orthohepadnavirüs genusundandır. 42 nm çapında zarflı bir deoksiribonükleik asit (DNA) virüsüdür. Karaciğerde replike olmakta hepatik disfonksiyona sebep olmaktadır. Hepatit B virüs enfeksiyonu ülkemizde ve dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur ve siroz ile hepatosellüler kanserin (HSK) en önemli nedenlerinden birisidir. Hepatit B virüsünün neden olduğu karaciğer hastalığının patogenezi önemli ölçüde immün aracılı mekanizmalara dayanmaktadır. Ancak, nadir olarak doğrudan hepatotoksik hasar da oluşturabilmektedir. Temel mekanizma, enfekte hepatositlerin, sitotoksik T hücre aracılığı ile lizise uğratılmasıdır (3, 4). Hepatit B enfeksiyonunda, sitotoksik T hücrelerden salınan IFN gama, karaciğerdeki makrofajları aktive ederek, bu makrofajlardan NP salınımını uyarmaktadır. Söz konusu T hücre ve makrofaj aktivasyonu da karaciğerde oluşan nekroenflamasyonun ve fibrozisin temel nedenini oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmalarda kronik hepatit B (KHB)'li hastalarda serum NP düzeylerinin arttığı saptanmış (5) ancak, literatürde serum NP'nin karaciğer hasarı ile ortaya çıkan fibrozis ile ilişkisini incelen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda temel olarak karaciğerdeki nekroenflamasyon ve fibrozis şiddetini ölçmek amacıyla karaciğer biyopsisi yapılmış ancak tedavi almamış Kronik Hepatit B tanılı hastaların serum neopterin düzeylerinin karaciğerdeki fibrozis ve

nekroenflamasyon düzeyleri ile korele olup olmadığının araştırılması ve neopterinin fibrozis ve nekroenflamasyon derecesini belirlemede bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Neopterin

2.1.1 Tarihçe

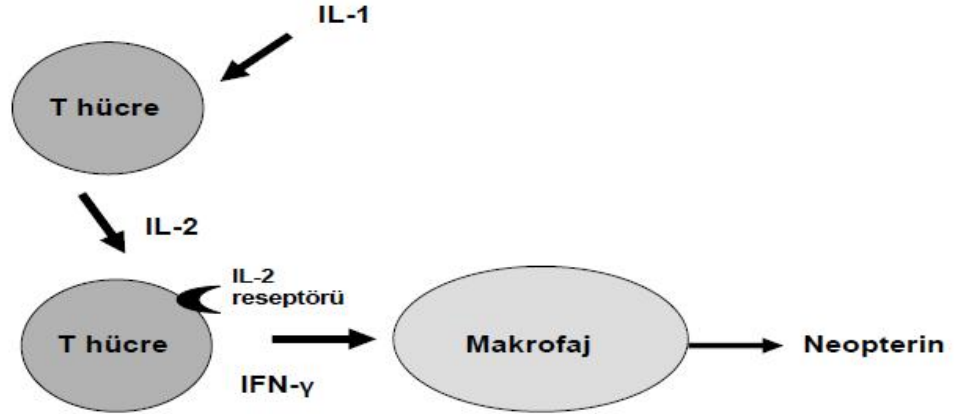
Neopterin, hücrel immun sistemin aktivasyonu oluşan IFN- γ 'nın stimule ettiği başlıca monosit ve makrofajlar tarafından üretilen bir pteridin türevidir (6,7). Pteridinler, ilk kez 1889 yılında izole edilmiştir (2). Başlangıçta böceklerin ve küçük vertebralıların bir pigmenti olarak tanımlanmış olup 1963 yılında işçi arıların larvalarında bulunmuştur (8-10). İnsanda ilk defa 1967 yılında Sakurai ve Goto tarafından idrarda saptanmıştır. Neopterin ile ilgili ilk makale ise 1979 yılında yayınlanmış olup bu makalede malign hastalıklarda ve viral infeksiyonlarda serum NP düzeyinin arttığı bildirilmiştir (8). 1982 ve 1983 yıllarında, kültüre edilmiş insan periferik kan mononükleer hücrelerinde antijenik uyarı sonucu NP birikimi gözlenmiştir. Bu çalışmaların sonucunda IFN- γ 'nın insan monosit ve makrofajlarında invitro olarak büyük miktarda NP üretimi ve salınımına yol açtığı bulunmuştur (8-10). Böylece farklı vücut sıvılarındaki NP konsantrasyon tayini ile T lenfosit ve makrofajların etyopatogenezinde yer aldığı birçok hastalığın tanısının konabileceği ve klinikte daha yaygın olarak kullanılabilmesi düşünceleri ortaya çıkmıştır (11). Günümüze kadar yapılan çok sayıda klinik ve deneysel çalışmada NP üretiminin hücrel immun aktivasyonla ilişkisi kanıtlanmış olup, NP düzeyleri ile enfeksiyöz ve enflamatuvar hastalıkların şiddeti ve progresyonu arasında güçlü bir bağlantının olduğu gösterilmiştir (1, 6,10).

2.1.2 Neopterin Kimyasal Yapısı

Aromatik pteridinler; 7, 8-dihidropteridinler, 5, 6, 7, 8-tetrahidropteridinler, lumazinler ve diğer pteridinler olarak yapılarına göre sınıflandırılmaktadır (2). Bu sınıflamaya göre, aromatik pteridin grubuna dahil edilen NP, düşük molekül ağırlıklı (253 Da), 2-amino-4 hidroksi (1'2'3'trihidroksipropil) pteridindir (7-10). Neopterin d-izomeri türevleri insan metabolizmasında önemli yer tutmaktadır. Neopterinin vücutta dihidroneopterin ve tetrahidroneopterin olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda neopterin sadece insan ve primatlarda bulunduğu, sıçan, kobay ve hamsterlerde ise NP'e rastlanmadığı saptanmıştır (8,11).

2.1.3 Neopterin Biyosentezi

Neopterin, aktif monosit ve makrofajlarda Guanozin Trifosfat'tan (GTP) GTP siklohidrolaz-1 enzimi aracılığı ile sentezlenmektedir (2,6,7). GTP siklohidrolaz-1 pteridin biyosentezinde anahtar rol oynayan enzimdir. Bu enzimin aktivitesi IFN- γ stimülasyonu ile büyük oranda artmaktadır. Bunun yanında IFN-alfa, diğer sitokinler ve endotoksinler de çok düşük oranlarda da olsa GTP siklohidrolaz-1 aktivitesini arttırabilmektedirler (2,6,9). Neopterin üretiminin en güçlü indükleyicisi, T lenfosit tip 1 ve natural killer (NK) hücrelerinden salınan interferon- γ 'dır. Bu nedenle, vücut sıvılarındaki NP konsantrasyonları interferon- γ varlığını göstermektedir. Dolayısıyla NP, hücresel aracılı immunitenin sensitif bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (2,6,9).



Şekil 1: Neopterin Biyosentezi (1)

İnsanda NP'nin temel kaynağı monosit ve makrofajlardır. Gelişimsel olarak monositten köken alan dendritik hücrelerin ve merkezi sinir sisteminde mikroglia hücrelerinin de NP salgıladığı saptanmıştır (12). İnterferon- γ ' nın yanısıra, interferon- α ve interferon- β ' nın da NP üretimini indükleyebileceği, ancak bu etkilerinin bu sitokinlerin daha yüksek konsantrasyonlarında başladığı bildirilmiştir (12). Tümör nekrotizan faktör- α (TNF- α) ise tek başına indükleyici değildir. Ancak, interferon- γ ile birlikte NP üretimini stimüle edebilmektedir (2). Bütün bunlara ek

olarak bakteriyel pirojenler ve toksinler de NP üretimini uyaran mekanizmaları harekete geçirebilmektedir (2).

Demirin immun sistem hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması üzerindeki önemli rolü, NP metabolizmasını da etkilemektedir (1). Hücre içi demir miktarının azalması NP üretiminin artışına sebep olmaktadır (13). Neopterinin, eritropoezis üzerinde dolaylı inhibitör etkisi de bulunmaktadır. Kronik hastalığı olanlarda, serum NP düzeyi ile serum demir, transferrin ve hemoglobin düzeyleri arasında negatif, ferritin düzeyi arasında ise pozitif bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir (1,13). Birçok kronik enfeksiyonda ve otoimmun olayda görülen anemi, NP'nin eritropoetin üretimini inhibe etmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır (13).

2.1.4 Neopterinin Fizyolojik Rolü

Neopterinin fizyolojik rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Neopterin, sadece TH 1 aracılı hücrel immun sistemin bir göstergesi değil, konak savunma reaksiyonlarında da fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları olan bir sitokindir (1). Yapılan pek çok çalışmada reaktif oksijen metabolitleriyle etkileşimin ve oksidatif stresin NP ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Neopterin, invaziv patojenlere karşı vücutta oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin sitotoksik etkilerini arttırarak savunmada önemli rol oynamaktadır. Serum NP düzeylerinin artışı ile enflamasyon, enfeksiyon ve malignitenin şiddetinin artması, NP'nin savunma sisteminin bir parçası olduğunu göstermektedir (14).

Neopterinin antioksidan özelliği de vardır. 7,8 dihidroneopterin yüksek konsantrasyonlarıyla oksidan ve antioksidan dengeyi bozmakta ve ortaya çıkan antioksidan etki, insan hücrelerinin apoptozisine yol açabilmektedir. Aynı zamanda 7,8 dihidroneopterin, linolat oksidasyonunu inhibe ederek lipid peroksil radikallerinin temizlenmesi şeklinde fonksiyon gösteren potent bir antioksidandır (14).

2.1.5 Neopterinin Klinik Önemi

Vücut sıvılarında NP ölçümü, hücrel immun yanıt düzeyi hakkında bilgi vermekte ve hastalık progresyonunu önceden tahmin etmeye yardımcı olmaktadır (2). Yüksek NP konsantrasyonları, monosit ve makrofaj aktivitesinin yoğun olduğu hastalıklarda gözlenmektedir. Neopterin salınımı, T lenfosit proliferasyonu en yüksek

düzeğe ulaşmadan 3 gün önce başlar ve spesifik antikorların pozitifleşmesinden yaklaşık 1 hafta önce NP üretiminde yükselme olması nedeniyle NP, erken enflamasyon göstergesi olarak kullanılabilir (15).

Hücreselel immun sistem göstergesi olan NP pek çok malignite, enfeksiyon hastalığı ve otoimmun hastalıkta klinik gidiş, prognoz ve tedaviye yanıtı değerlendirmek amacıyla birçok vücut sıvılarında çalışılmış ve bu hastaların neredeyse tümünün kan ve idrarında yükselmiş NP seviyeleri tespit edilmiştir (2).

Vücut sıvılarındaki NP düzeyleri, aralarında tüberküloz, Human Immunodeficiency Virüs (HIV) enfeksiyonu, HBV enfeksiyonu, Hepatit C (HCV) enfeksiyonu gibi viral enfeksiyonlarının da bulunduğu enfeksiyon hastalıkları, otoimmun hastalıklar, sepsis, maligniteler, allograft reddi, sarkoidoz, multipl sklerozun aktivasyonu, koroner arter hastalığı, miyokard enfaktüsü, kardiyak ve renal yetmezlikte de yüksek bulunmuştur (16- 23).

2.1.6 Neopterin Ölçme Yöntemleri ve Vücut Sıvılarında Neopterin

Düzeyleri

Neopterin, vücut sıvılarında stabil olduğu için rutin laboratuvar testleriyle ölçümü yapılabilir. Neopterinin serum konsantrasyonu, idrar konsantrasyonundan düşüktür (9). Damar dışına çıkmamakta ve böbreklerden değişime uğramadan atılmaktadır. Bu nedenle idrar NP seviyesi ile dolaylı olarak IFN-gama seviyesi değerlendirilebilir.

Vücut sıvılarında NP yüksek performanslı likid kromatografisi (HPLC), radio immun assay (RIA) ve enzim linked immünosorbant assay (ELISA) yöntemleriyle ölçülebilir (2,6). ELISA yönteminde, NP'e özel bağlanma bölgeleri kullanılarak, serumdaki işaretlenmemiş NP ile peroksitle işaretlenmiş NP'nin bağlanması amaçlanmaktadır. ELISA yöntemi için serum ve idrar örnekleri 24 saate kadar 2-8° C'de, 6 aya kadar -20°C'de ışıktan korunarak saklanabilir (6). Daha uzun süreli saklamalarda ise -80°C kullanılmalıdır. Serum dışında beyin omurilik sıvısı, sinovyal sıvı, pankreatik sıvı, idrar, tükürük gibi çeşitli biyolojik materyallerden de NP izole edilebilir (1,2).

2.1.7 Serumda Neopterin

Sağlıklı erişkin bireylerde RIA ve ELİSA yöntemleri ile saptanan serum NP düzeyleri 1.34 ± 0.68 ng/mL dir (7). 3 ng/mL üst limit olarak kabul edilmektedir (2,6). Serum NP konsantrasyonları yaşa bağımlı olduğunu savunan çalışmalar vardır (2). 18 yaşın altındaki çocuklarda ortalama 1.72 ng/mL ve 75 yaşın üzerindeki yaşlılarda ortalama 2.45 ng/mL' dir (2,11). Yaşlı ve çocuklarda daha yüksek olmakla birlikte, cinsiyet ile ilişkisi olmadığı düşünülmektedir (2).

2.1.8 Neopterin ve Otoimmün Hastalıklar

Romatoid artrit, glomerulonefrit, sjögren sendromu, sistemik lupus eritematozus, diyabetes mellitus, akut romatizmal ateş, crohn hastalığı, ülseratif kolit ve graves hastalığında da gerek serum gerekse idrarda NP düzeylerinin arttığı izlenmiştir. Otoimmün hastalıklarda makrofaj infiltrasyonu gelişen vücut sıvısı ve dokularda NP üretimi söz konusudur (1,2,6).

2.1.9 Neopterin ve Diğer Hastalıklar

Ateroskleroz gibi bazı kalp hastalıklarında da NP düzeyi arttığını saptayan çalışmalar bulunmaktadır (2). Birçok malignite tipinde de serum NP konsantrasyonları artmış olarak saptanmış ve bu artış tümör evresi ve kötü prognozla korele bulunmuştur. Yüksek serum ve/veya idrar NP düzeyleri akciğer, over, serviks, meme, tiroid, pankreas ve kolon kanseri ile multipl myelomda görülmektedir (2,9,22). Ayrıca serum ve/veya idrarda artmış NP seviyeleri, böbrek yetmezliği, diyabetik nefropati, glomerulonefrit, hepatit B virüsüne bağlı nefropati ve renal transplant reddinde saptanmıştır (2,7). Akut pankreatit, tip 2 diyabet ve sarkoidoz gibi çeşitli hastalıklarda da serum NP düzeyleri yüksek bulunan çalışmalar vardır (2).

2.1.10 Neopterin ve Enfeksiyon Hastalıkları

Hücrel immun cevabı tetikleyen başta virus enfeksiyonları olmak üzere bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlarda da vücut sıvılarında NP düzeylerinde önemli oranda artış görülmektedir (2,11).

2.1.10.1 Bakteriyel Enfeksiyonlar ve Neopterin:

Bakteriyel enfeksiyonlarda serum NP düzeyleri yüksek bulunmaktadır (2). En yüksek NP konsantrasyonları septik komplikasyonların varlığında görülür (2,7). Sepsisli hastalarda NP düzeyleri ile mortalite arasında da anlamlı bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir. Ancak serum NP düzeyleri, enflamasyon ile enfeksiyon ayırımında yetersiz kalabilmektedir (24).

Özellikle intrasellüler bakterilerle oluşan enfeksiyonlarda, savunmadan sorumlu primer lenfokin interferon- γ olduğundan, bu tür enfeksiyonlarda daha yüksek serum NP düzeyleri görülmektedir (25). *Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu enfeksiyonlarda hücrel immünite ana rol oynamaktadır. Dolayısıyla akciğer tüberkülozunda hastalık reaktivasyonu ve tedaviye direnç gelişimiyle serum NP üretiminde artış saptanmakta ve bu durum klinisyene hastalık progresyonu ve tedaviye yanıtı değerlendirmede fayda sağlayabilmektedir (7). Benzer olarak, aktif lepralı hastalarda serum NP düzeylerinde yükselme gözlenebilmekte ve tersine immünsupresif tedavi süresince azalmaktadır (2). Ayrıca, yine söz konusu hastalıklarda serum NP konsantrasyonu, eritrosit sedimentasyon hızı ve lökosit sayısı artışı ile de korelasyon göstermekte ve NP düzeylerinin, hastaların klinik değişimini radyolojik incelemelerden bile daha hızlı yansıttığı bildirilmektedir (26).

Brusellozda ise serum NP düzeyi yüksek olarak belirlenmiş ve yapılan bir çalışmada tedavi sonrası dönemde tedaviye yanıtı olmayan hastaların serum NP düzeyleri ile tedaviye yanıtı olan hastaların serum düzeyleri karşılaştırılmış ve tedaviye yanıtı olmayan hastalarda daha yüksek serum NP düzeyleri bulunmuştur. Bu nedenle NP düzeylerinin tedaviye yanıtı değerlendirmek için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği görüşüne varılmıştır (27).

2.1.10.2 Viral Enfeksiyonlar ve Neopterin:

Serum NP düzeyleri, viral enfeksiyonlarda (ör; HIV, Sitomegalovirüs (CMV), HBV ve HCV) artmaktadır (2,16). Akut viral hepatitler, Epstein-Barr virüs (EBV) enfeksiyonu, kızamık, kabakulak, rubella ve influenza enfeksiyonlarında da serum NP düzeylerinde artış görülmektedir (7, 18).

Vücut sıvılarında yükselmiş NP düzeyleri enkübasyon süresinin sonunda klinik semptomlar başlamadan hemen önce saptanmakta ve klinik semptomların başlamasıyla birlikte belirgin bir artış göstermektedir. En yüksek düzeyleri virüse karşı spesifik antikör tespitinden hemen önce saptanmakta, bu da NP üretiminde artışın başlamasından iki-dört hafta sonrasına denk gelmektedir. Konvelesan dönemde nötralizan antikörlerin ortaya çıkışından sonra ise azalarak normale döndüğü görülmektedir (28).

Ebstein-Barr virüs ve CMV tarafından oluşturulan enfeksiyöz mononükleozlu hastalarda yüksek serum NP konsantrasyonları bildirilmiştir (29). Küçük çocuklarda suçiçeği infeksiyonunun dramatik şekilde yükselen serum NP konsantrasyonu ile ilişkili olduğu ve artış düzeylerinin tipik olarak yeni lezyonların sonlanmasıyla saptandığı bildirilmektedir. Daha sonraki dönemde NP düzeyinde karakteristik olarak hızlı bir azalma gözlenmektedir (11).

Kazanılmış immün yetmezlik sendromlu (KİYS) hastalarda ve KİYS' in prodromal safhası olan lenfadenopati sendromlu hastalarda serum NP konsantrasyonu dramatik olarak yükselmekte ve hatta asemptomatik seropozitif hastalarda bile yüksek NP düzeyleri saptanabilmektedir (14). Yapılan bir çalışmada seropozitif HIV-1 asemptomatik hastalarda serum ve idrarda NP düzeyi artışı saptanmış, hastaların 3 yıllık izlemleri sonucu AIDS gelişen hastalarda hem serum hem de idrar NP düzeylerinin daha da yükseldiği görülmüştür. Bu nedenle NP'nin hastalık progresyonunu gösteren prediktif bir belirteç olduğu sonucuna varılmıştır (30).

HBV enfeksiyonunda ortaya çıkan klinik tablodan T hücre ve makrofajların rol aldığı immün yanıt sorumludur ve bu immün yanıt sırasında aktive olmuş makrofajlardan NP salınımı gerçekleşmektedir. Serum ve idrar NP düzeylerinin hem akut hem de kronik hepatit B enfeksiyonunda arttığı gösterilmiştir (31). Yapılan çalışmalarda serum NP düzeylerinin, sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında akut hepatit B ile KHB'li hastalarda ve HBV'e karşı doğal bağışık kişilerde arttığı saptanmıştır (5). Kronik hepatit B'li hastalarda ise, interferon tedavisi sırasında serum veya idrar NP ölçümlerinin hücresel immunitiyi değerlendirmede belirleyici olarak kullanılabileceği ileri sürülmüş ve serum NP düzeylerinin serum DNA polimeraz aktivitesi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (31). HBV'e ikincil hepatosellüler kanser ve sirozlu hastalar ile

sağlıklı kontrollerin karşılaştırıldığı çalışmalarda, serum ve idrar NP düzeylerinin HSK ve sirozlu hastalarda kontrol grubundan yüksek olduğu belirlenmiştir (32).

2.1.10.3 Paraziter Enfeksiyonlar ve Neopterin:

Malarya ve şistozomiazis gibi paraziter enfeksiyonlarda da NP düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (2,7).

2.2 HEPATİT B VIRUSU

2.2.1 Giriş

Hepatit B virüsü, kronik karaciğer hastalıklarının dünyadaki en yaygın nedenlerinden biridir (33). Dünya genelinde 2 milyardan fazla kişi HBV ile enfektir ve bunlardan 350-400 milyondan fazla sayıda kişide Kronik Hepatit B (KHB) enfeksiyonu varlığı tahmin edilmektedir (34,35). Hepatit B virüs enfeksiyonu halen ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülmekte olup kronikleşen viral hastalıkların başında gelmektedir. Etkili bir aşısı olan HBV enfeksiyonu yüksek morbidite ve mortaliteye neden olması nedeniyle önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir (34-36) HBV enfeksiyonu, % 15 - 40 oranında siroz, KC yetmezliği ya da HSK ile sonuçlanmaktadır. HBV'e ikincil gelişen terminal dönem KC hastalığı, özellikle ülkemizde karaciğer transplantasyonunun en sık nedenidir (34).

2.2.2 Virolojik Özellikler

Hepatit B virüsü, Hepadnaviridae ailesinden Orthohepadnavirüs genusundandır. 42 nm çapında, sferik biçimde, çift kılıflı, küçük sirküler DNA genomuna sahip zarflı bir virüstür. Karaciğerde replike olup hepatik disfonksiyona sebep olmaktadır. Konak hücreden kazanılmış olan lipid zarf üzerinde Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) bulunmaktadır (36). Hepatit B virüsü ile enfekte hastaların kanında elektron mikroskopu ile üç ayrı viral partikül gösterilmiştir. Bunlardan biri olan Dane partikülü tam HBV vironu olup enfeksiyöz karakterde olan partiküldür. Sferik partiküller ile filamentöz partiküller ise HBV yüzey antijeninin farklı formlarını içerirler ve enfeksiyöz değildirler. Virüs replikasyonu sırasında fazla miktarda

üretilem ve oldukça immünojenik olan bu partiküllere karşı nötralizan antikorlar sentezlenmektedir (3).

Hepatit B core antijen (HBcAg) nükleokapsitteki viral DNA'dan üretilen peptiddir. HBcAg'nin sentezinde rol aldığı peptidler, hepatosit yüzeyinde bulunmakta ve hücreyel immün yanıtı indükleyerek enfekte hücrelerin öldürülmesinde rol oynamaktadır (37). HBcAg, sadece hepatositte bulunur ve seruma geçişi yoktur.

Hepatit B virüs e antijeni (HBeAg) core geninden üretilen peptiddir, aktif viral replikasyon ve enfeksiyözitenin göstergesi olarak kabul edilmektedir. HBcAg'nin sadece karaciğer dokusu içinde bulunmasına karşın HBeAg hücreden dışarı salınmaktadır (38). HBcAg ile çapraz immünoreaktivitesi nedeniyle, konak immün yanıtını virüsle enfekte hücrelerden uzak tutma görevini üstlendiği düşünölmektedir. HBeAg sentezlenemeyen mutant virüslerle oluşan enfeksiyonlarda daha ağır hepatik hasar görülmesi de bu şekilde açıklanmaya çalışılmaktadır (37).

DNA polimeraz, aminoasit dizilimi ve fonksiyon açısından retroviral revers transkriptaz enzimine benzemektedir. Her iki enzim de viral bir kor içinde aktivite göstermektedir (3).

X geni, viral replikasyon için önemli olan iki transkripsiyon aktivatörünü kodladığı düşünölen küçük bir gendir. Aktif viral replikasyonun en iyi belirteci ise HBV DNA'dır (39).

2.2.3 Epidemiyoloji ve Bulaş

Hepatit B virüsü, temel olarak parenteral yolla, enfekte kan ve sıvılarla perkütan ve mukozal temas, taşıyıcı anneden bebeğe bulaş (vertikal bulaş) ve enfekte kişiyle cinsel ilişki ile bulaşmaktadır (3). Bu bulaş yollarının dışında aynı ev içinde, yakın yaşama koşullarında (horizontal bulaş) HBV bulaşı olmaktadır. Özellikle HBV taşıyıcılarının aile bireylerinde diğer bulaşma yollarının söz konusu olmadığı durumlarda ortak yaşam koşullarının bulaşmaya neden olduğu düşünölmektedir (40). Endemik bölgelerde virüsün cilt çatlakları ve müköz membranlardan geçişi çocuklarda enfeksiyona neden olabilir (41, 42). Hepatit B virüs enfeksiyonunun insidansı ve bulaş yollarının ağırlığı ile çeşidi, toplumlar arasında farklılıklar göstermektedir. (3). Virüs, insan vücudu dışında yedi günden uzun süre

canlı kalabildiği için enfekte diş fırçası ve jiletler de bulaş kaynağı olabilmektedir (41).

HBV'nin neredeyse tüm vücut sıvılarında bulunduğu saptanmıştır. Virion miktarının en fazla olduğu vücut sıvıları; serum, kan ve yara eksudası iken plevra ile periton sıvılarında da serumdaki kadar virion bulunur. Semendeki virüs yükü serumdakine göre 10^3 kez daha azdır ancak, semende sürekli enfeksiyöz partiküller bulunmaktadır. Virüs yükünün en az miktarda olduğu vücut sıvıları ise, idrar, feçes, ter, gözyaşı ve anne sütüdür.

2.2.4 Dünyada HBV Enfeksiyonu

Hepatit B virüs enfeksiyonunun dünyadaki dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar gösterebilmektedir. Bu farklılıklar nedeniyle dünya yüksek, orta ve düşük endemisite bölgelerine ayrılmıştır (3,42).

1.Yüksek endemisite :

HBsAg pozitifliği %7'in üzerindedir. Japonya ve Hindistan dışında kalan birçok Asya ülkesi, Amazon bölgesi, Alaska, Pasifik adaları ve Sahra altı Afrika'dır. Bu bölgelerde enfeksiyonların hemen hemen hepsi perinatal dönemde veya erken çocukluk döneminde alınmıştır (3,43).

2.Orta endemisite:

HBsAg prevalansı %2-7 arasındadır. Orta endemisite profili, Türkiye'nin de içinde Orta ve Güney Avrupa, Hindistan, Kuzey Afrika, Japonya, Güney ve Orta Amerika, Orta Asya ve Orta Doğu'da bulunduğu izlenmektedir (42,43). Bu bölgelerde enfeksiyon çoğunlukla çocukluk, ergenlik veya genç erişkinlik dönemlerinde alınmaktadır ve bu nedenle akut enfeksiyon daha sık olarak görülmektedir (39, 43).

3. Düşük endemisite:

HBsAg prevalansı %2'den azdır. Etken ile çoğunlukla erişkin dönemde karşılaşmaktadır. En sık bulaş yolu cinsel yoldur. Düşük endemisite profili, Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda gibi gelişmiş ülkeleri kapsamaktadır (3, 42, 43).

2.2.5 Patogenez

Hepatit B virüs enfeksiyonunda karaciğer hasarının oluşmasında viral faktörlerden çok konak immun yanıtının rolü vardır (3). Virüsün temizlenmesi ve karaciğer hasarı, özgül immun yanıtlara bağlıdır. Akut HBV enfeksiyonunda CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtları görülmektedir. CD4+ T hücre yanıtı viral proteinlere karşı gelişmektedir (44). Hepatit B virüs spesifik CD4+ T hücreler aynı zamanda HBV spesifik sitotoksik T hücrelerini (STH) aktive etmekte ve bu STH'ler hem enfeksiyon kontrolünden, hem de karaciğerde oluşan doku hasarından sorumlu olmaktadır. Virüsün karaciğerden temizlenemediği kronik enfeksiyonlarda ise hastaların periferik kanlarında zayıf CD4+ T hücre yanıtı ve beraberinde zayıf CTL yanıtı bulunmaktadır (3,45,46).

Virüse karşı gelişen immun yanıtta sitotoksik hücrelerin yanında enflamatuvar sitokinlerin de rol aldığı bilinmektedir. Özellikle TNF-alfa ve IFN-gama, HBV'e karşı immun yanıtta etkili rol almaktadırlar. Sitokinler, konak savunmasında viral replikasyonu baskılayarak doğrudan ve hangi tip immun yanıtın baskın olacağını belirleyerek dolaylı rol oynamaktadırlar (45). Akut HBV enfeksiyonunda güçlü poliklonal hücresel yanıt hastalık seyrini etkilemede önemlidir. Etkin immün yanıtın başlatılması için Tip 1 IFN salınımı gereklidir. İmmun yanıt gelişimi ile HBV DNA düzeyleri düşürüldükten sonra doğal ve özgül immun yanıt hücreleri karaciğerde hepatit gelişimine yol açmaktadır. CD8+T lenfositlerinin enfekte hepatositleri ortadan kaldırması, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) yükselmesi ile beraber görülmektedir. Bunu izleyen dönemde antikor yanıtı gelişmekte, bellek hücreleri oluşarak reeneksiyon ve reaktivasyon önlenmektedir. Akut yanıtta yetersizlik olunca enfeksiyon kronikleşmektedir (47).

Akut HBV enfeksiyonunu takiben kronikleşme erişkinlerin %4,6'sında görülür (48). HBsAg pozitif anneden doğan bebeklerde HBV'nin ortadan kaldırılması güçtür ve kronikleşme oranı %95'i bulmaktadır. Yenidoğan dönemi sonrası, altı yaş altı çocuklarda kronikleşme oranı %30'lar civarında olup, uzun dönemde siroz, karaciğer yetmezliği ve HSK gibi ciddi sonuçlar izlenebilmektedir (39).

İnsanlarda HBV enfeksiyonunun seyri dört ayrı dönem içermektedir:

1. İmmuntoleran dönem:

Doğumda ya da erken çocuklukta alınan enfeksiyondan sonra ortaya çıkan dönemdir. Konağın immun sisteminin olgunlaşmaması sebebiyle yetersiz immun yanıt gelişimi ya da intrauterin hayatta anneden bebeğe geçen HBV antijenlerine karşı gelişen immun tolerans nedeniyle HBV ile enfekte hepatositlere karşı yeterli immun yanıt gelişmemektedir. Bunun sonucunda HBV sürekli replike olmakta, fakat immun yanıt olmadığı için karaciğerde nekroenflamasyon ve fibrozis gelişmemektedir. Transaminaz değerleri ise normaldir. Bu dönem spontan HBeAg serokonversiyonu ile birlikte 10-30 yıl sürmektedir (3, 49).

2. İmmünlirens Dönemi:

HBeAg (+) KHB'li hastalarda immun sistem genellikle adölesan dönem veya erişkin yaşlarda olgun hale geldikçe HBV antijenlerine karşı yetersiz de olsa bir immun yanıt gelişmektedir. İmmun yanıt ikincil hepatosellüler hasar oluşmaya başlamakta ve immuntolerans fazından bu döneme geçiş genellikle yaşamın 2. ya da 3. dekadında olmaktadır. Serumda HBeAg varlığı, yüksek HBV DNA düzeyleri, transaminaz yüksekliği ve karaciğerde aktif enflamasyon ve bazen fibrozis bulguları saptanmaktadır. Bu dönemde bazı hastalar tamamen asemptomatik olabilirken, bazı hastalar semptomatik olarak akut hepatiti taklit eden ve hatta fulminan hepatik yetmezliğe kadar gidebilen hepatik ataklar geçirebilmektedirler (49).

3. İnaktif HBsAg taşıyıcılığı:

İmmun temizlenme döneminin sonunda enfekte hücre kitlesinin ve virüs replikasyonunun azalması dolayısıyla immun yanıtın azalmasını takiben transaminaz düzeylerinin normal, viral replikasyonun az ve nekroenflamatuvar aktivitenin hafif olduğu döneme girilmektedir. Serumda HBeAg kaybolmakta, anti HBe ortaya çıkmaktadır. Bu evrede HBsAg olasılıkla, hepatosit genomunda entegre olan S geni nedeniyle bir süre daha pozitif bulunabilmektedir. Hastaların çoğu yıllarca bu fazda kalarak yaşamlarına devam etmektedir (3, 49).

4. HBeAg Negatif KHB (Reaktivasyon dönemi):

İnaktif döneme giren hastaların bir kısmında virüs replikasyonu ve karaciğerdeki hücre harabiyeti geri dönebilmektedir. Bu durum, çocukluk çağında enfekte olanlarda ve Asya ile Doğu Avrupa'da daha sık görülmektedir. Bu dönem,

serumda HBeAg negatif, Anti HBe pozitif, saptanabilir serum HBV DNA düzeyleri, yükselmiş serum ALT seviyeleri ve karaciğerin devam eden nekroenflamasyonunun histolojik bulguları ile karakterizedir (49).

2.2.6 Klinik Özellikler

Hepatit B virüsünün enkübasyon periyodu, alınan virüs miktarına ve kişinin immünite durumuna bağlı olarak virüs ile karşılaşmayı izleyen 45-180 gün arasında değişmektedir (3). Hastalığın klinik özelliği oldukça değişkenlik göstermektedir. Hastaların yaklaşık yarısı asemptomatiktir. Akut viral hepatitli genç ve erişkinlerin %50'sinde sarılık görülürken, diğer akut viral hepatitlerle ayırımı yapılamamaktadır. Yorgunluk, halsizlik, grip-benzeri yakınmalar, bulantı-kusma ve anoreksi gibi semptomlar görülebilmektedir. Fizik muayenede sarılık, hepatomegali saptanabilmekte veya karın muayenesi tamamen normal olabilmektedir. Vaskülit, immun kompleks nefriti, artrit, serum hastalığı benzeri hastalık ve poliarteritis nodoza gibi ekstrahepatik bulgular da zaman zaman eşlik edebilmektedir (39,50).

Kronik HBV enfeksiyonu, genellikle asemptomatik seyretmektedir. En önemli semptom, yorgunluk ve halsizliktir olmakta beraber özellikle akut alevlenmelerde belirgin olmak üzere iştahsızlık, bulantı, kusma, üst karın bölgesinde rahatsızlık hissi, kas-eklem ağrıları da tabloya eşlik edebilmektedir. Birçok hastada biyokimyasal testler normal olarak saptanmaktadır (3).

Kronik HBV enfeksiyonlu kişilerde siroz ve primer HSK gelişme riski önemli ölçüde yüksektir. Bu hastalıkların gelişme riski, kronik enfeksiyonlu hastaların yaşına ve hastalığa sahip olduğu süreye bağlı olarak da değişiklik göstermektedir (3,51). Erişkin ve genç KHB enfeksiyonlu hastalarda siroz veya HSK gelişme oranı %15'tir. Hastada eşlik eden HIV enfeksiyonu, diyabet, alkol kullanımı ve böbrek yetmezliği gibi başka kronik hastalığının olması hepatitin kronikleşme riskini artırmaktadır (49-52).

Kronik HBV enfeksiyonunda prognoz; aktif viral replikasyon ve karaciğer hasarının derecesi ile ilişkilidir. Kronik enfekte olguların yarısında aktif viral replikasyon vardır ve serum aminotransferaz değerleri yüksektir. Bu olguların %15-20'sinde beş yıl içinde siroz gelişmektedir. Kronik enfekte olguların her yıl %7-

10'sinde spontan HBeAg negatifleşmesi görülmektedir. HBsAg'nin spontan kaybı ise daha nadirdir ve her yıl olguların %1-2 'sinde görülmektedir (53). İnaktif HBsAg taşıyıcısı hastaların serum aminotransferaz düzeyleri ve karaciğer histolojisi genellikle normal bulunmakta ve prognozu daha iyi seyretmektedir. 'Sağlıklı taşıyıcı' olarak adlandırılan bu hastalarda immünolojik tolerans olduğu düşünülmektedir. HBeAg negatif olan ve aktif viral replikasyonu olmayan bu olgularda karaciğer hastalığının alevlenmesi daha az sıklıkta olmakta, böyle bir alevlenmenin ardından HBsAg'nin spontan kaybı %15 gibi oranlara ulaşabilmektedir (3,54).

2.2.7 HBV Enfeksiyonunda Tanı Yöntemleri

Kronik HBV enfeksiyonunun tanısı, serumda HBV enfeksiyonunun serolojik ve virolojik göstergeleri ile karaciğer hastalığının biyokimyasal ve histolojik göstergelerinin birlikte değerlendirilmesi ile konulmaktadır (55).

2.2.7.1 Serolojik Tanı

HBsAg, hastalık semptomları ortaya çıkmadan yaklaşık 2 hafta önce serumda saptanabilir düzeye ulaşmaktadır. İyileşen olgularda 2-6 ay içinde azalarak ortadan kaybolmakta ve HBsAg serumdan kaybolduktan bir müddet sonra serumda anti HBs ortaya çıkmakta ve hayat boyu saptanabilmektedir. Akut HBV enfeksiyonundan sonra HBsAg serumda 6 aydan uzun süre pozitif kalıyorsa hastalığın kronikleştiği kabul edilmektedir (56).

HBeAg, HBsAg'nin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra ortaya çıkmakta, HBsAg' den önce de kaybolmaktadır. HBeAg, viral replikasyon ile ilişkili bir serolojik göstergedir. HBeAg'nin serumda negatifleşmesinden kısa bir süre sonra anti HBe ortaya çıkmaktadır. Bazı olgularda kısa bir süre HBeAg ve anti HBe serumda birlikte bulunabilmektedir. Anti HBe antikorlarının ortaya çıkışı viral replikasyonun azaldığını ve hastalığın iyileşmekte olduğunu göstermektedir. Ancak HBV'nin prekor mutant suşlarının meydana getirdiği enfeksiyon sırasında anti HBe pozitifleşmesine rağmen aktif viral replikasyon devam etmektedir (56). Bu durum ülkemizin de aralarında bulunduğu Akdeniz havzasında daha sık görülmekte ve görülme oranı %75' lere ulaşmaktadır.

Anti HBc IgM, enfeksiyon başladıktan birkaç hafta sonra pik seviyelere ulaşmaktadır. Hastalığın başlangıcından 4-8 ay (bazen 12 ay) sonra serumda tespit edilememektedir. Anti-HBc IgM, akut enfeksiyon sırasında pencere döneminde (Anti HBs ve HBsAg'nin saptanamadığı dönemde) enfeksiyonun tek göstergesi

olabilmektedir. Diğer bir önemli özelliği de kronik enfeksiyonun akut alevlenmeleri sırasında da pozitifleşmesidir. Ancak bu pozitiflik kronik dönemde düşük titrelerde olabilmektedir. Anti HBc IgG, Anti HBc IgM antikorlarının görülmesinden çok kısa bir süre sonra ortaya çıkmakta ve Anti HBc IgM 'nin tersine yaşam boyu pozitif kalmaktadır (5,56).

2.2.7.2 Moleküler Tanı

1980'li yıllardan itibaren serolojik yöntemlerin yanı sıra kronik hepatitlerde HBV DNA bakılması da hastanın içinde bulunduğu klinik dönemin değerlendirilmesi açısından büyük öneme sahiptir. HBV DNA; kalitatif ve kantitatif olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tayin edilebilmektedir. HBV DNA kantitasyonu, HBV replikasyonunun izlenmesi açısından önemlidir, bunun için sinyal ve hedef amplifikasyon temelli testler ve PZR temelli testler kullanılmaktadır. Sinyal amplifikasyon testlerinin dezavantajı düşük miktarlardaki HBV DNA'yı (<5000 kopya/ml) saptayamamasıdır. Hedef amplifikasyon testlerinin duyarlılığı çok daha yüksektir (<10 kopya/ml). Moleküler tanı konusunda en önemli gelişme ise, HBV DNA testlerinin sensitivitesini arttıran gerçek zamanlı PZR tekniğinin ortaya çıkması ile yaşanmıştır. Böylece kantitatif sonuçlar daha kısa sürede verilmekte ve farklı HBV genotipleri saptanabilmektedir (56).

2.2.7.3 Histopatolojik Tanı-Karaciğer Biyopsisi

Karaciğer biyopsisinin amacı, karaciğerde meydana gelen hasarın seviyesini belirlemek ve diğer karaciğer hastalığı etkenlerini dışlamaktır (57). Hepatik aktivite indeksi ilk kez Knodell tarafından 1981'de yayınlanmıştır. Karaciğer biyopsisinde daha objektif sonuçlar verilebilmesi amacıyla düzenlenmiş sayısal bir sistemdir. Bu sisteme göre periportal köprüleşme nekrozu, intralobüler dejenerasyon ile fokal nekroz, portal inflamasyon ve fibrozis değerlendirilmektedir. İlk üçünün değerlendirilmesinden elde edilen sayısal değerlerin toplamı histolojik aktivite indeksi (HAİ) olarak belirlenmiştir ve karaciğerdeki enflamasyonun şiddetini göstermektedir. Maksimum puan 18'dir. Fibrozis düzeyleri ise 0, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 olarak değerlendirilir. Fibrozisin ≥ 5 olması sirozu göstermektedir (58). Modifiye HAİ, orijinal Knodell sisteminin bir devamı olup, kullanımda ortaya çıkan bazı sorunların aşılmasını amaçlayan bir seri değişiklik içermektedir (59). Bu sistem

günümüzde kronik hepatit olgularının histopatolojik değerlendirmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (**Tablo 1**)

Modifiye HAI Derecelendirmesi	SKOR
Nekroenflamatuvar skorlar	
A. Periportal veya periseptal interface hepatiti (piecemeal nekroz)	
Yok	
Hafif (Fokal , birkaç portal alanda)	0
Hafif/ Orta (Fokal , portal alanların çoğunda)	1
Orta (Trakt veya septaların %50'sinden azında, çevresinde devamlılık gösteren)	2
Şiddetli (Trakt veya septaların %50'sinden fazlasında, çevresinde devamlılık gösteren)	3
	4
B. Konfluent nekroz	
Yok	0
Fokal konfluent nekroz	1
Zon 3 nekroz (bazı alanlarda)	2
Zon 3 nekroz (çoğu alanlarda)	3
Zon 3 nekroz + seyrek portal- santral köprüleşme	4
Zon 3 nekroz + çok sayıda portal- santral köprüleşme	5
Panasiner veya multiasiner nekroz	6
C. Fokal (spotty) litik lezyon, apoptozis ve fokal enflamasyon	
Yok	0
1 veya daha az odak (x100'lük her büyütmede)	1
2-4 odak (x100'lük her büyütmede)	2
5-10 odak (x100'lük her büyütmede)	3
10'dan fazla odak (x100'lük her büyütmede)	4
D. Portal Enflamasyon	
Yok	0
Hafif (bazı ve tüm portal alanlarda)	1
Orta (bazı ve tüm portal alanlarda)	2
Orta/ belirgin (tüm portal alanlarda)	3
Belirgin (tüm portal alanlarda)	4
Modifiye HAI evrelendirmesi	
Yapısal değişiklikler, fibrozis, siroz	
Fibrozis yok	0
Birkaç portal alanda fibröz genişleme ve ± kısa fibröz septa	1
Çoğu portal alanda fibröz genişleme ve ± kısa fibröz septa	2
Çoğu portal alanda fibröz genişleme ve seyrek portal-portal köprüleşme	3
Portal alanlarda fibröz genişleme ve belirgin köprüleşme	4
Belirgin köprüleşme ile seyrek nodül (inkomplet siroz)	5
Siroz (olası ve kesin)	6

Tablo 1: Modifiye Histolojik Aktivite İndeksi

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma yerleri ve Zamanı;

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında 04 Ocak 2013-25 Kasım 2013 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmanın laboratuvar işlemleri, DEÜTF Tıbbi Mikrobiyoloji AD Seroloji Biriminde yapıldı.

Etik kurul onayı;

Çalışmayla ilgili olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 03.01.2013 tarihinde 101-SBKAEK protokol numarası ve 2013/01-02 karar numarası ile etik kurul onayı alındı.

Aydınlatılmış onam;

Hastalar, çalışma düzeni hakkında bilgilendirildi ve çalışmaya dahil edilmeden önce her hastaya aydınlatılmış onam formu okutularak imzalatıldı.

Hasta alımı;

Bu konuda yapılmış bir çalışma bulunmadığı için standart etki değerleri kullanılarak ve gruplar arasında fazla bir fark ortaya çıkacağı öngörüldüğü için etki büyüklüğü 0.40 alınarak örnek büyüklüğü hesaplandığında her grup için %80 gücünde ve %95 güven düzeyinde çalışmaya dahil edilecek hasta sayısı hesaplandı. Çalışmaya 04 Ocak 2013 - 01 Ekim 2013 tarihleri arasında DEÜTF Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı polikliniği ve DEÜTF İç Hastalıkları AD Gastroenteroloji Dal polikliniğine başvuran KHB tanılı hastalar alındı. Kronik hepatit B tanı kriterlerine uyan, takip ile tedavi kararı açısından başvuru tarihinden önceki son 1 yıl içinde ve başvuru sonrasında karaciğer biyopsisi yapılmış ancak tedavi almamış hastalar gönüllü ve 18 yaşından büyük olması koşuluyla dahil edildi. Hastalar, neopterin ve çalışma düzeni hakkında bilgilendirildi ve çalışmaya dahil edilirken her hastaya aydınlatılmış onam formu okutularak imzalatıldı. Bu sırada hastaların demografik verileri kaydedildi.

Aşağıdaki kronik hepatit B tanı kriterlerine uyan hastalar çalışmaya dahil edildi.

Kronik Hepatit B Tanı Kriterleri (55):

- ü HBsAg'nin en az 6 ay süreyle pozitif saptanması
- ü HBeAg'nin en az 3 ay süreyle pozitif saptanması
- ü Akut hepatit B enfeksiyonu semptomlarının 6 aydan uzun süre devam etmesi
- ü Akut hepatit B enfeksiyonu sonrası serum bilirubin, serum AST ve ALT düzeyi ile serum glukoz düzeyinin 6-12 ay süresince normale dönmemesi
- ü Karaciğerde köprüleşme veya multilobuler nekroz varlığı

Dışlama kriterleri;

- a. 18 yaşından küçük hastalar
- b. Altta yatan ek bir kronik karaciğer hastalığı (HBV dışı bir nedenle gelişmiş siroz, alkolik karaciğer hastalığı, otoimmün hepatit...) varlığı
- c. HCV-HDV-HIV ile koinfeksiyonu
- d. Herhangi bir malignite varlığı
- e. Daha önce ve hâlihazırda kronik hepatit B tanısıyla antiviral tedavi kullanım öyküsünün bulunması
- f. İmmüsupresyona yol açan ilaç kullanımı
- g. Gebelik
- h. Otoimmün bir hastalık bulunması

Veri toplanması:

Çalışmaya kabulü yapılan hastaların, poliklinik ziyareti sırasında neopterin ve çalışma düzeni hakkında bilgi verildikten sonra demografik verileri, karaciğer enzim düzeyleri, HBV DNA düzeyleri, HBV seroloji sonuçları, karaciğer biyopsisi ile saptanmış olan hepatik aktivite indeksi ve fibrozis skoru önceden hazırlanmış olan olgu rapor formlarına kaydedildi.

Kayıt edilen veriler;

ü Demografik veriler;

- a. Hastanın Adı-Soyadı
- b. Cinsiyeti
- c. Yaş
- d. Boy
- e. Ağırlık

ü Ek hastalık varlığı

ü Kullanılmakta olan ilaçlar

ü HBV taşıyıcılık süresi

ü Karaciğer enzimleri (AST ve ALT)

ü Serolojik veriler (HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc total)

ü HBV-DNA (IU/ml)

ü Histolojik Aktivite İndeksi (HAI)

ü Fibrozis skoru

Örnek toplanması ve saklanması:

Başvuran ve çalışma kriterlerini karşılayan hastalardan rutin kontrol amaçlı istenen biyokimyasal ve hematolojik testler için kan alımı sırasında ayrıca 10 cc'lik biyokimya tüplerine de kan alındı. Alınan kan örnekleri 5000 devirde 3 dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmında toplanan serum, DNAaz/RNAaz dan arındırılmış 2 ml hacimli steril şeffaf mikrosantrifüj tüplerine alındı. Söz konusu serum örnekleri, ELISA çalışmasının yapılacağı güne kadar güneş ışığından korunarak ve -20°C'de saklandı.

İstatistiksel analizler:

Veriler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 15.0 programına kaydedildi. Tanımlayıcı istatistiklerde sayı, yüzde, ortalama \pm standart sapma (minimum-maksimum değerler); gruplar arası ortalamaların karşılaştırmasında 'Bağımsız iki örnek T testi' kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı 'Kolmogorov-Smirnov' testi ile değerlendirildi. Korelasyonların değerlendirilmesinde 'Pearson ve Spearman korelasyon analizleri' kullanıldı. Korelasyon değerlendirilirken korelasyonun gücü, korelasyon katsayısı (correlation coefficient= r_s) ile değerlendirilirken, $r_s < 0,25$ ise **zayıf** ilişki, $0,25 \leq r_s \leq 0,50$ **orta güçlü** ilişki, $0,50 < r_s < 0,75$ **güçlü** ilişki, $0,75 \geq r_s$ **çok güçlü** ilişki olarak değerlendirildi. Çalışmada HBsAg pozitif olan hastaların sayısı 30'dan küçük olması nedeniyle nonparametrik veriler, Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney U testi ile analiz edildi. Veriler arasındaki formülize ilişkinin gösterilmesinde regresyon analizinden faydalanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

GEREKLİ MALZEMELER

Hasta örneklerinin toplanması ve depolanması aşamasında kullanılanlar;

1. 10 cc hacminde steril plastik enjektör
2. 10 cc hacminde kırmızı kapaklı biyokimya tüpü
3. 2 cc hacimde steril, şeffaf, DNAaz/ RNAaz dan arındırılmış mikrosantrifüj tüpü
4. NF 815 santrifuj cihazı (Nüve)
5. Derin dondurucu (-20 °C ile -40 °C derece aralığında)

Serum örneklerinin çalışılabilmesi için gerekli laboratuvar malzemeleri;

1. 1-10, 10-100 ve 100-1000 μ l'lik pipet ucu uyumlu otomatik pipetler
2. Vorteks karıştırıcı
3. Orbital karıştırıcı (30-300rpm)
4. 30-300 μ l lik 8 kanallı otomatik pipet
5. Mikrotitre plaka ELISA okuyucu (450nm absorban okuma özelliğinde)

6. Distile su
7. Sarı pipet ucu (20-200µl)
8. Mavi pipet ucu (100-1000µl)
9. Human Serum Neopterin ELISA kit (DRG® Neopterin)

Human Serum Neopterin ELISA kit içinde bulunan malzemeler

1. 96 kuyucuklu (12x8 lik) mikrotitre plaka (poliklonal antikor ile kaplı)
2. Neopterin, peroksidaz, fosfat tampon ve stabilizör içeren 0,3 mL Enzim Konjugat Konsantresi
3. Neopterin, fosfat tampon, stabilizör ve koruyucu madde olarak timerosal içeren ve her biri 0.5 mL'lik sekiz adet standart (0; 0.5; 1.5; 3.0; 6.0; 12.0; 24.0; 100.0 ng /L)
4. İki adet kontrol (her biri 0.5 mL)
5. İnsan serumu, tavşan serumu, koruyucu madde olarak timerosal ve fosfat tampon salin içeren Neopterin Enzim Seyreltici (18mL)
6. 10 mL Tween ve stabilizör içeren yıkama tamponu (10 kat yoğunlaştırılmış)
7. Tetrametilbenzidin, tampon ve stabilizör içeren Renkli Substrat (Color Substrat) solüsyonu (11 mL)
8. Dilüe sülfirik asit içeren stop solüsyonu (11 mL)

Testin Çalışma Prensibi

Katı faz Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) testi, yarışmalı ELISA yönteminin basit prensibine dayanmaktadır. Bu prensibe göre, örnek içindeki miktarı bilinmeyen antijen ile belli bir miktar enzim işaretli antijen, antikor bağlanma bölgeleri (anti-tavşan-neopterin) için yarışmaktadır. Her iki antijen-antikor kompleksi, keçi anti-tavşan Ig G ile kaplı mikrotitre plaka kuyucuklarına bağlanmakta, bağlanmamış antijen yıkama ile uzaklaştırılmaktadır Substrat enkübasyonu sonrası fotometre ile ölçülen renk yoğunluğu, örnekteki antijen miktarı ile ters olarak ölçülmektedir. Örneklerin sonuçları doğrudan standart eğri kullanılarak gösterilmektedir.

Serum neopterin düzeylerinin ELISA yöntemi ile manuel olarak çalışılması:

1. Öncelikle -20°C'de saklanan standartlar, kontroller, hasta serumları ile +4°C'de saklanan plaka ve reaktanlar oda sıcaklığına getirildi.
2. Çalışılacak hasta serum örnekleri, her bir hastaya bir sayı verilerek numaralandırıldı.
3. Plakadaki kuyucuklara 25µl **standart**, **kontrol** ve hasta **serumları** kondu (Tablo 2).

NSB	NSB	STD8	STD8	H11	H19	H27	H35	H43	H51	H59	NSB: Non Specific Binding
STD1	STD1	CTRL1	CTRL1	H12	H20	H28	H36	H44	H52	H60	
STD2	STD2	CTRL2	CTRL2	H13	H21	H29	H37	H45	H53	H61	STD: Standart Solüsyonu
STD3	STD3	H1	H 6	H14	H22	H30	H38	H46	H54	H62	
STD4	STD4	H2	H 7	H15	H23	H31	H39	H47	H55	H63	CTRL: Kontrol Solüsyonu
STD5	STD5	H 3	H 8	H16	H24	H32	H40	H48	H56	H64	
STD6	STD6	H 4	H 9	H17	H25	H33	H41	H49	H57		H:Hasta serumu
STD7	STD7	H 5	H 10	H18	H26	H34	H42	H50	H58		

Tablo 2: NSB, Standart solüsyonları, Kontroller ve Serum Örneklerinin Kuyucuklara Yerleşimi

4. **NSB** (Non-Specific Binding), 25µl kadar 0 ng /L'lik standart solüsyonu ile 100µl Neopterin Enzim Seyreltici solüsyon ile karıştırılarak elde edildi.
5. Neopterin enzim konjugat, 1:100 oranında Enzim Seyreltici solüsyon ile dilüe edilerek kullanıma hazır hale getirildi.
6. NSB'nin bulunduğu kuyucuklar hariç her bir kuyucuğa 100µl dilue edilmiş **enzim konjugat** eklendi.
7. Mikrotitre plakanın üstü adeziv folyo ile kaplandı.
8. **120 dakika** oda sıcaklığında (**18-25°C**) 100 rpm'de orbital karıştırıcı üzerinde enkübe edildi.
9. Enkübasyon süresi tamamlanınca adeziv folyo çıkarıldı.

10. Enkübe edilen plaka içeriğinin tamamı ters yüz edilerek döküldü.
11. Yıkama tamponu, 1:10 oranında distile su ile seyreltilerek hazır hale getirildi.
12. Her bir kuyucuk 3 kez 100µl lik **yıkama tamponu** ile yıkandı.
13. Yıkama sonrası kâğıt bir havlu üzerine plaka ters çevrilerek yıkama tamponunun fazla miktarı ortamdaki uzaklaştırıldı.
14. Substrat ve stop solüsyonunun eklenmesinde pipetlemenin aynı zaman aralıklarıyla yapılabilmesi için 8-kanallı pipet kullanıldı.
15. Her kuyucuğa 100µl **Renkli Substrat** solüsyonu eklendi.
16. 30 dakika kadar oda sıcaklığında ve orbital karıştırıcı üzerinde 100 rpm'de enkübe edildi.
17. Substrat reaksiyonu, enkübasyon sonrası her kuyucuğa 100µl **Stop Solüsyonu** eklenerek durduruldu.
18. Plaka hafifçe sallanarak içerik karıştırıldı.
19. Ardından optik yoğunluk, fotometre ile 450nm dalga boyunda ölçüldü.
20. ELISA okuyucu cihazı ile yapılan ölçümlerde, kontrollerin ve hasta serumlarının absorbans ve neopterin düzeyleri saptandı.
21. Sonuçlar ng/mL cinsinden kaydedildi (**Tablo 3**).

Plate 1: plate 1

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A					0.952 Un_0011 1/1 1:1 3.547	1.165 2.361 1:1 2.361	1.596 1.107 Un_0027 1/1 1:1 1.107	1.489 1.335 Un_0035 1/1 1:1 1.335	1.359 1.675 Un_0043 1/1 1:1 1.675	1.382 1.609 Un_0051 1/1 1:1 1.609	1.375 1.629 Un_0059 1/1 1:1 1.629	-0.049 NaN Un_0067 1/1 1:1 NaN
B		1.457 1.413 K1_0001 1/2 1:1 1.413	1.358 1.679 K1_0001 2/2 1:1 1.679	1.017 3.119 Un_0012 1/1 1:1 3.119	0.947 3.582 Un_0020 1/1 1:1 3.582	1.595 1.108 Un_0028 1/1 1:1 1.108	1.395 1.573 Un_0036 1/1 1:1 1.573	1.241 2.062 Un_0044 1/1 1:1 2.062	1.069 2.821 Un_0052 1/1 1:1 2.821	1.398 1.565 Un_0060 1/1 1:1 1.565	-0.051 NaN Un_0068 1/1 1:1 NaN	
C		0.666 6.911 K2_0001 1/2 1:1 6.911	0.612 8.089 K2_0001 2/2 1:1 8.089	0.994 3.259 Un_0013 1/1 1:1 3.259	1.133 2.507 Un_0021 1/1 1:1 2.507	1.095 2.686 Un_0029 1/1 1:1 2.686	1.410 1.533 Un_0037 1/1 1:1 1.533	1.105 2.640 Un_0045 1/1 1:1 2.640	1.458 1.410 Un_0053 1/1 1:1 1.410	1.503 1.303 Un_0061 1/1 1:1 1.303	-0.050 NaN Un_0069 1/1 1:1 NaN	
D		0.920 3.787 Un_0001 1/1 1:1 3.787	1.057 2.884 Un_0006 1/1 1:1 2.884	1.174 2.322 Un_0014 1/1 1:1 2.322	1.329 1.764 Un_0022 1/1 1:1 1.764	1.388 1.592 Un_0030 1/1 1:1 1.592	1.398 1.567 Un_0038 1/1 1:1 1.567	1.450 1.431 Un_0046 1/1 1:1 1.431	1.379 1.618 Un_0054 1/1 1:1 1.618	1.562 1.176 Un_0062 1/1 1:1 1.176	-0.051 NaN Un_0070 1/1 1:1 NaN	
E		1.186 2.275 Un_0002 1/1 1:1 2.275	0.935 3.668 Un_0007 1/1 1:1 3.668	0.999 3.231 Un_0015 1/1 1:1 3.231	0.917 3.807 Un_0023 1/1 1:1 3.807	0.931 3.701 Un_0031 1/1 1:1 3.701	1.152 2.419 Un_0039 1/1 1:1 2.419	1.302 1.850 Un_0047 1/1 1:1 1.850	0.951 3.556 Un_0055 1/1 1:1 3.556	1.593 1.112 Un_0063 1/1 1:1 1.112	-0.050 NaN Un_0071 1/1 1:1 NaN	
F		1.102 2.652 Un_0003 1/1 1:1 2.652	1.038 2.993 Un_0008 1/1 1:1 2.993	1.075 2.792 Un_0016 1/1 1:1 2.792	1.170 2.341 Un_0024 1/1 1:1 2.341	0.717 6.040 Un_0032 1/1 1:1 6.040	1.548 1.204 Un_0040 1/1 1:1 1.204	1.500 1.310 Un_0048 1/1 1:1 1.310	1.346 1.715 Un_0056 1/1 1:1 1.715	0.975 3.385 Un_0064 1/1 1:1 3.385	-0.051 NaN Un_0072 1/1 1:1 NaN	
G		0.923 3.761 Un_0004 1/1 1:1 3.761	1.008 3.171 Un_0009 1/1 1:1 3.171	1.026 3.062 Un_0017 1/1 1:1 3.062	1.062 2.857 Un_0025 1/1 1:1 2.857	1.416 1.516 Un_0033 1/1 1:1 1.516	1.430 1.482 Un_0041 1/1 1:1 1.482	1.480 1.356 Un_0049 1/1 1:1 1.356	1.201 2.215 Un_0057 1/1 1:1 2.215	0.000 NaN Un_0065 1/1 1:1 NaN	-0.050 NaN Un_0073 1/1 1:1 NaN	
H		1.203 2.207 Un_0005 1/1 1:1 2.207	0.969 3.426 Un_0010 1/1 1:1 3.426	0.984 3.324 Un_0018 1/1 1:1 3.324	1.505 1.300 Un_0026 1/1 1:1 1.300	1.444 1.444 Un_0034 1/1 1:1 1.444	1.503 1.302 Un_0042 1/1 1:1 1.302	1.075 2.788 Un_0050 1/1 1:1 2.788	1.453 1.422 Un_0058 1/1 1:1 1.422	-0.002 NaN Un_0066 1/1 1:1 NaN	-0.051 NaN Un_0074 1/1 1:1 NaN	

Tablo 3: Fotometre ile Ölçülen Kontrol-1, Kontrol-2 ve Hasta Serumlarının

Absorbans ve Serum Neopterin Düzeyleri

22. Testin çalışabilirliğini saptamak için MNPk1305 LOT numaralı kite ait kalite-kontrol sertifikasında yer alan kontrollere için verilmiş neopterin referans aralıkları kullanıldı (Tablo 4).

	Değer	Kontrol	Neopterin (ng/mL)	Aralık
Absorbans	2.13	MNPk 1305 EI	0.98	0.84-1.24
		MNPk 1305 EII	5.68	5.20-7.60

Tablo 4: Kontrol Solüsyonlarının Fotometrik Ölçümlerinin Referans Aralıkları

3. BULGULAR:

Çalışmamıza toplam 64 hasta dâhil edildi. Bu hastaların 39'u (%60.9) son 1 yıl içinde biyopsi yapılmış, 25'i (%39.1) ise, başvuru tarihinden sonra biyopsi uygulanmış hastalardı. Hastaların 42'si (%65.6) erkek, 22'si (%34.4) kadındı. Hastaların yaşlarının 18 ile 66 arasında değiştiği ve ortalama yaşın 38 ± 12.4 olduğu saptandı. Hastaların serum HBV DNA düzeylerinin 2494 IU/mL ile 544.677.156 IU/mL arasında değiştiği ve ortalama serum HBV DNA düzeylerinin $38.169.286,47 \pm 107.479.306,463$ IU/mL olduğu saptandı. Çalışmaya dahil edilen hastaların serum ALT değerleri 8 mg/dL ile 290 mg/dL arasında değiştiği ve ortalama serum ALT değerlerinin 77.81 ± 64.98 mg /dL olduğu görüldü.

Çalışmamızda yaş ile neopterin düzeyleri arasındaki ilişkiye bakıldığında olumlu yönde, zayıf güçte ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir ilişki saptandı ($r_s=0.228$, $p= 0.07$). Hastalar, onar yıllık yaş gruplarına göre sınıflandırıldığında ve bu grupların ortalama serum neopterin düzeylerine bakıldığında istatistiksel anlamlılık saptanmadı (Tablo 5).

Tablo 5: Yaş gruplarına göre ortalama serum neopterin düzeylerinin dağılımı

YAŞ GRUPLARI	n	SERUM NEOPTERİN MİKTARI (ng/mL)	
GRUP I (18-27)	13	1.98 ± 0.62	p=0.402
GRUP II (28-37)	16	2.19 ± 0.85	
GRUP III (38-47)	19	2.51 ± 1.00	
GRUP IV (48-57)	11	2.31 ± 0.79	
GRUP V (58-67)	5	3.18 ± 1.88	

Cinsiyete göre neopterin düzeylerine bakıldığında kadın ve erkek cinsiyet arasında neopterin düzeyleri açısından istatistiksel anlamlılık saptanmadı (Tablo 6).

Tablo 6: Cinsiyete göre ortalama serum neopterin düzeyleri

CİNSİYET	n	NEOPTERİN	
ERKEK	42	2.42 ± 1.05	p=0.329
KADIN	22	2.16 ± 0.83	

Serum neopterin ile serum ALT değerleri arasındaki ilişki incelendiğinde, olumlu yönde, zayıf güçte ve istatistiksel anlamlı olmayan bir ilişki ($r_s=0.207$, $p=0.101$) saptandı. Ayrıca serum neopterin ile serum HBV DNA değerleri arasında da olumlu yönde, zayıf güçte ve istatistiksel anlamlı olmayan bir ilişki olduğu görüldü ($r_s=0.189$, $p=0.134$).

Çalışmaya alınan 64 hastanın en düşük HAI skoru 1 olarak saptanırken, en yüksek HAI skoru 13 olarak saptandı ve ortalama HAI skoru $5,88 \pm 2,69$ olarak bulundu (**Tablo 7**).

Tablo 7: HAI skoruna göre hasta sayısı ve ortalama serum neopterin düzeylerinin dağılımı

HİSTOLOJİK AKTİVİTE İNDEKSİ	HASTA SAYISI (n-%)	ORTALAMA SERUM NEOPTERİN DÜZEYİ (ng/mL)	p DEğERİ
1	1 (1.6)	2.34	<0.001
2	5 (7.8)	1.73 \pm 0.81	
3	8 (12.5)	1.68 \pm 0.81	
4	11 (17.2)	1.88 \pm 0.75	
5	6 (9.4)	3.04 \pm 0.82	
6	2 (3.1)	1.53 \pm 0.32	
7	15 (23.4)	2.35 \pm 0.81	
8	6 (9.4)	2.60 \pm 0.74	
9	4 (6.3)	3.05 \pm 0.68	
10	3 (4.7)	3.07 \pm 0.55	
11	1 (1.6)	1.60	
12	1 (1.6)	6.04	
13	1 (1.6)	2.85	

Çalışmamızda serum neopterin düzeyleri ile Histolojik Aktivite İndeksi (HAI) arasında olumlu yönde, orta güçte ve istatistiksel anlamlı bir ilişki saptandı ($r_s=0.489$, $p<0.001$).

Çalışmaya dahil edilen hastaların HAI skorları 1-4, 5-8 ve 9-13 olarak 3 gruba ayrılarak incelendiğinde gruplar arasında serum neopterin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu saptandı (**Tablo 8**).

Tablo 8: HAI gruplarına göre hasta sayısı ve ortalama serum neopterin düzeylerinin dağılımı

HAI GRUPLARI	HASTA SAYISI (n)	ORTALAMA SERUM NEOPTERİN DÜZEYİ (ng/mL)	p DEĞERİ
1-4	25	1.80 ± 0.75	<0.001
5-8	29	2.48 ± 0.83	
9-13	10	3.19 ± 1.19	

Gruplar arasında serum neopterin düzeyleri arasında saptanan farkın, hangi gruptan kaynaklandığı incelendiğinde ise, HAI skoru 1-4 olan gruptan kaynaklandığı saptandı ($p < 0,001$).

Hastaların HAI skoru ile serum neopterin düzeyi arasındaki bağlantı incelendiğinde, ' $HAI = (Neopterin - 1.354) \div 0.167$ ' olarak bir formüle edildiği görülmüştür.

Çalışma kapsamına alınan hastalar, fibrozis skoru açısından değerlendirildiğinde, en düşük fibrozis skoru 0 saptanırken en yüksek fibrozis skoru 5 olarak saptandı ve ortalama fibrozis skoru 1.13 ± 1.42 olarak bulundu (**Tablo 9**).

Tablo 9: Fibrozis skoruna göre hasta sayısının ve ortalama serum neopterin düzeylerinin dağılımı

FİBROZİS SKORU	HASTA SAYISI (n-%)	ORTALAMA SERUM NEOPTERİN DÜZEYİ (ng/mL)	p DEĞERİ
0	31 (48.4)	2.00 ± 0.84	0.001
1	16 (25.0)	2.31 ± 0.87	
2	1 (1.6)	3.11	
3	11 (17.2)	2.68 ± 0.72	
4	4 (6.3)	3.55 ± 1.85	
5	1 (1.6)	3.38	

Hastaların fibrozis skoru 0-2 ve 3-5 olarak iki grup halinde incelendiğinde,iki grup arasında serum neopterin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı. Hastaların fibrozis skoru gruplarına göre serum neopterin düzeyi ve hasta dağılımları **Tablo 10**'da verilmiştir.

Tablo 10: Fibrozis skoru gruplarına göre hasta sayısı ve ortalama serum neopterin düzeylerinin dağılımı

FİBROZİS SKORU GRUPLARI	HASTA SAYISI (n)	ORTALAMA SERUM NP DÜZEYİ (ng/mL)	p DEĞERİ
Grup I (0-1-2)	48	2.13 ± 0.86	0.010
Grup II (3-4-5)	16	2.94 ± 1.09	

64 hastanın fibrozis skoru ile serum neopterin düzeyi arasındaki ilişkiye bakıldığında, olumlu yönde, orta kuvvette ve istatistiksel anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($r_s=0.400$, $p=0.001$).

Hastaların fibrozis skoru ile serum neopterin düzeyi arasındaki bağlantı incelendiğinde, '**Fibrozis skoru = (Neopterin-2.002) ÷ 0.295**' olarak bir formülize edildiği görülmüştür

Hastaların 16' sında (%25) HBeAg pozitif saptanırken, 48 (%75) hastada HBeAg negatif ve anti HBe pozitif olarak saptandı. Hastaların demografik verileri **Tablo 11**'de sunulmuştur.

Tablo 11: HBeAg serolojisine göre hastaların cinsiyet ve yaş dağılımı

	HBeAg(+) n (%)	HBeAg(-) n (%)
Hasta Sayısı	16 (%25)	48(%75)
Cinsiyet	K: 6 (%37.5) E:10 (%62.5)	K: 16 (%33.3) E: 32 (%66.7)
Yaş	29 ± 11.04	41 ± 11.67

HBeAg pozitif hastalar ile HBeAg negatif hastalar karşılaştırıldığında;

- ü HBeAg (+) olanlar ile (-) olanlar arasında ortalama neopterin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (**p=0.664**).
- ü HBeAg (+) olanlar ile (-) olanlar arasında serum ALT değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (**p=0.100**).
- ü HBeAg (+) olanlar ile (-) olanlar arasında fibrozis skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (**p= 0.264**)
- ü HBeAg (+) olanlar ile (-) olanlar arasında HAI skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (**p=0.046**).
- ü HBeAg (+) olanlar ile (-) olanlar arasında serum HBV-DNA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (**p<0.001**)
- ü HBeAg pozitif/negatif hastalara ait bulgular **Tablo 12**' de sunulmuştur.

Tablo 12: HBeAg pozitif ve negatif hastaların karşılaştırılması

	HBeAg (+)	HBeAg (-)	p değeri
Ortalama Serum Neopterin Düzeyi (ng/mL)	2.39 ± 0.86	2.31 ± 1.02	0.664
Serum ALT (mg/dL)	99.25 ± 72.312	70.67 ± 61.506	p=0.100
Fibrozis skoru	1.31 ± 1.25	1.06 ± 1.47	p= 0.264
HAI	7.06 ± 2.67	5.48 ± 2.61	p=0.046
Ortalama Serum HBV DNA düzeyi (IU/mL)	147.128.009 ± 177.367.515,72	1.849.712,29 ± 7.445.613,52	p<0.001

HBeAg Pozitif Olan Hastaların Fibrozis ve HAI Skoru ile Serum NP Düzeyleri İlişkisi

HBeAg pozitif 16 hastanın fibrozis skoru incelendiğinde en düşük fibrozis skorunun 0, en yüksek fibrozis skorunun 3 olduğu görüldü. Fibrozis skoru 0 olan 5 hasta, 1 olan 6 hasta, 3 olan 5 hasta olduğu belirlendi. Hastaların fibrozis skoruna göre ortalama serum neopterin değerlerinin dağılımları **Tablo 13'**de sunulmuştur.

Tablo 13: HBeAg pozitif hastalarda fibrozis skoruna göre ortalama serum neopterin düzeylerinin dağılımı

Fibrozis Skoru	Hasta sayısı (n-%)	Ortalama serum neopterin düzeyleri (ng/mL)	p değeri
0	5 (31.3)	1.97 ± 1.04	0.034
1	6 (37.5)	2.25 ± 0.81	
3	5 (31.3)	2.99 ± 0.39	

HBeAg (+) hastaların HAI skorlarına bakıldığında ise, en düşük HAI skorunun 3, en yüksek HAI skorunun 13 olduğu saptandı. HAI skorlarına göre hasta sayısı dağılımları ve ortalama serum neopterin düzeyleri **Tablo 14** 'de sunulmuştur.

Tablo 14: HBeAg pozitif hastalarda HAI skoruna göre hasta sayısı ve serum neopterin düzeylerinin dağılımı

HAI Skoru	Hasta sayısı (n-%)	Ortalama serum neopterin düzeyleri (ng/mL)	p değeri
3	1 (6.3)	1.10	0.009
4	3 (18.8)	1.67 ± 0.73	
5	1 (6.3)	2.99	
7	5 (31.3)	2.29 ± 0.81	
8	2 (12.5)	2.86 ± 1.13	
9	1 (6.3)	2.82	
10	2 (12.5)	3.17 ± 0.74	
13	1 (6.3)	2.85	

HBeAg (+) Hastalarda Serum Neopterin Düzeylerinin Korelasyon Sonuçları

- ü Serum **neopterin** düzeyi ile **yaş** arasında olumlu yönde, güçlü derecede ve istatistiksel anlamlı bir ilişki saptandı ($r_s= 0.565$, $p=0.023$). '**HBeAg (+) KHB'li hastalarda yaş arttıkça serum neopterin düzeyi de anlamlı olarak artar.**'
- ü Serum **neopterin** düzeyleri ile **fibrozis skoru** arasında olumlu yönde, güçlü derecede ve istatistiksel anlamlı bir ilişki saptandı ($r_s= 0.532$, $p=0.034$). '**HBeAg (+) KHB'li hastalarda fibrozis skoru arttıkça serum neopterin düzeyi de anlamlı olarak artar.**'

- ü Serum **neopterin** düzeyi ile **HAI** arasında olumlu yönde, güçlü derecede ve istatistiksel anlamlı bir ilişki saptandı ($r_s= 0.628$, $p=0.009$). '**HBeAg (+) KHB'li hastalarda HAI skoru arttıkça serum neopterin düzeyi de anlamlı olarak artar.**'
- ü Serum **neopterin** düzeyi ile serum **HBV DNA** düzeyi arasında olumsuz, zayıf derecede ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan ilişki saptandı ($r_s= -0.124$, $p=0.649$).
- ü Serum **neopterin** düzeyi ile serum **ALT** düzeyi arasında olumsuz, zayıf derecede ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan ilişki saptandı ($r_s= -0.062$, $p=0.820$).

HBeAg Negatif Olan Hastaların Fibrozis ve HAI Skoru ile Serum NP Düzeyleri İlişkisi

HBeAg (-) olan 48 hastanın fibrozis skorları incelendiğinde, en düşük fibrozis skoru 0, en yüksek fibrozis skoru 5 saptandı. Hastaların fibrozis skoruna göre hasta dağılımları ve ortalama serum neopterin düzeyleri **Tablo 15'** de sunulmuştur.

Tablo 15: HBeAg negatif hastalarda fibrozis skoruna göre hasta sayısı ve serum neopterin düzeylerinin dağılımı

Fibrozis Skoru	Hasta sayısı (n-%)	Ortalama serum neopterin düzeyleri (ng/mL)	p değeri
0	26 (54.2)	2.01 ± 0.83	0.011
1	10 (20.8)	2.34 ± 0.94	
2	1 (2.1)	3.11	
3	6 (12.5)	2.41 ± 0.85	
4	4 (8.3)	3.55 ± 1.85	
5	1 (2.1)	3.38	

HBeAg negatif olan 48 hastanın HAI skorları incelendiğinde, en düşük HAI skoru 1, en yüksek HAI skoru 12 saptandı. Hastaların HAI skoruna göre hasta dağılımları ve ortalama serum neopterin düzeyleri **Tablo 16'** da sunulmuştur.

Tablo 16: HBeAg negatif hastalarda HAI skoruna göre hasta sayısı ve serum neopterin düzeylerinin dağılımı

HAI Skoru	Hasta sayısı (n-%)	Ortalama serum neopterin düzeyleri (ng/mL)	p değeri
1	1 (2.1)	2.34	p=0.002
2	5 (10.4)	1.73 ± 0.81	
3	7 (14.6)	1.76 ± 0.84	
4	8 (16.7)	1.95 ± 0.79	
5	5 (10.4)	3.04 ± 0.91	
6	2 (4.2)	1.53 ± 0.32	
7	10 (20.8)	2.38 ± 0.86	
8	4 (8.3)	2.47 ± 0.65	
9	3 (6.3)	3.12 ± 0.81	
10	1 (2.1)	2.88	
11	1 (2.1)	1.60	
12	1 (2.1)	6.04	

HBeAg Negatif Hastalarda Serum Neopterin Düzeylerinin Korelasyon Sonuçları

- ü Serum **neopterin** düzeyi ile **yaş** arasında olumlu yönde, orta kuvvette ve istatistiksel anlamlı bir ilişki saptandı ($r_s= 0.308$, $p=0.033$). '**HBeAg (-) KHB'li hastalarda yaş arttıkça serum neopterin düzeyi de anlamlı olarak artar.**'

Ü Serum **neopterin** düzeyleri ile **fibrozis skoru** arasında olumlu yönde, orta kuvvette ve istatistiksel anlamlı bir ilişki saptandı ($r_s= 0.365$, $p=0.011$).

‘HBeAg (-) KHB’li hastalarda fibrozis skoru arttıkça serum neopterin düzeyi de anlamlı olarak artar.’

Ü Serum **neopterin** düzeyi ile **HAI** arasında olumlu yönde, orta kuvvette ve istatistiksel anlamlı bir ilişki saptandı ($r_s= 0.444$, $p=0.002$).

‘HBeAg (-) KHB’li hastalarda HAI skoru arttıkça serum neopterin düzeyi de anlamlı olarak artar.’

Ü Serum **neopterin** düzeyi ile serum **HBV DNA** düzeyi arasında olumlu, zayıf ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan ilişki saptandı ($r_s= 0.243$, $p=0.096$).

Ü Serum **neopterin** düzeyi ile serum **ALT** düzeyi arasında olumlu, zayıf ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan ilişki saptandı ($r_s= 0.247$, $p=0.09$).

5. TARTIŞMA:

Neopterin, aktive olmuş T hücrelerinin IFN-gama ile stimülasyonu sonucunda insan monosit ve makrofajları tarafından üretilmektedir (6). Yapılan çok sayıda çalışmada NP üretiminin hücrel immun aktivasyonla ilişkisi kanıtlanmış ve NP düzeyleri ile enfeksiyöz ve enflamatuar hastalıklar arasında güçlü bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (1,6,10). Neopterin üretiminin en güçlü indükleyicisi tip 1 T lenfosit ve NK hücrelerinden salınan interferon- γ 'dır (2,6,9). Hücrel immun sistem göstergesi olarak, pek çok malignite, enfeksiyon hastalığı ve otoimmün hastalıkta kan ve idrarda NP seviyeleri artmaktadır (2,6). HIV, CMV, HBV ve HCV gibi birçok virüs enfeksiyonunda da serum ve idrarda NP seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (2,20).

Kronik hepatit B'de karaciğer hasarı, immun yanıt nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bu immun yanıtta T hücreleri ve makrofajlar rol almaktadır. Karaciğerde parankim ve perilobüler alana yayılmış lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan nekroz görülmektedir. Karaciğerde oluşan nekroenflamasyondan sorumlu T lenfositlerden salgılanan IFN-gama makrofajları aktive etmektedir. Aktive olmuş makrofajlardan salgılanan NP'nin kronik karaciğer hastalığında enflamasyonun göstergesi olabileceği varsayılmaktadır (60).

KHB'li hastalarda karaciğer hasarı ile gelişen nekroinflamasyon ve fibrozisin saptanabilmesi için en sık kullanılan yöntem karaciğer biyopsisidir. Bu invaziv işlem 1/4.000-1/10.000 arasında sıklıkta komplikasyon görülme riski taşımaktadır (61). Klinik uygulamada hastaların bu işlemi kabul etmekte zorlandıkları gözlemlenmiş ve karaciğer biyopsisi gibi invaziv bir işlem yerine uygulanabilecek invaziv olmayan göstergelerin kullanılması fikrinin doğmasına yol açmıştır.

Literatüre bakıldığında yapılan çalışmalarla HBV enfeksiyonunda serumda NP düzeylerinin arttığı gösterilmiş ancak serum NP düzeylerinin karaciğerde oluşan fibrozisle olan ilişkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda Kronik Hepatit B'li hastalarda serum neopterin düzeylerinin fibrosis skoru ve hepatik aktivite indeksi ile korelasyonu araştırılarak, serum neopterin düzeylerinin karaciğerde oluşan nekroinflamasyonun varlığı ve derecesinin bir göstergesi olarak kullanılıp kullanılmayacağının saptanması amaçlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada herhangi bir hastalıkla ilişkisi olmaksızın serum NP düzeylerinin yaş ile değiştiği gösterilmiştir (11). 18 yaş altında ve 75 yaş üzerinde serumda NP düzeyi yüksek saptanırken, 18-75 yaş arası döneme bakıldığında yaş ile ilişkili NP düzeyinde değişim görülmemektedir (2,6). **Daito ve ark.'nın** hastaların 8'i 30 yaş üzerinde, 6'sı 30 yaş altında olması koşuluyla 14 KHB'li hasta üzerinde yaptığı çalışmada, serum NP düzeyleri ile yaş arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (31). **Lucas ve ark.'nın** yaptıkları çalışmada ise, enfeksiyon hastalığı olmayan, stres altındaki 302 sağlıklı erişkinde hastaların yaşı arttıkça serum NP düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (62). Çalışmamızda serum NP düzeyleri ile hasta yaşları arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Çalışmamıza dahil edilen hastaların yaşlarının 18-66 arasında değiştiği ve hastaların yaşları arttıkça serum neopterin düzeylerinin arttığı görülmüştür. Yaş ile serum neopterin düzeyi arasındaki ilişki, istatistiksel anlamlı saptanmamıştır ($p=0.07$). Hastalar, onar yıllık yaş gruplarına ayrıldığında da yaş gruplarına göre serum NP düzeylerinin arttığı ancak yaş grupları ile serum neopterin düzeyleri arasında istatistiksel bir anlamlılık olmadığı saptanmıştır ($p=0.402$).

Çalışmamız **Daito ve ark. nin** (31) çalışması ile uyumluluk göstermesine rağmen **Daito ve ark. nin** (31) çalışma grubundaki olgu sayısının az olması dikkat çekicidir. Ancak çalışmamızın sonuçları, **Lucas ve ark.'nın** (62) yaş ile ilgili çalışması ile uyumluluk göstermemiştir. Fakat **Lucas ve ark.'nın** (62) çalışmasında olgular arasında enfeksiyonlu hasta bulunmaması önemlidir. Yaş ile birlikte immun yanıtın değiştiği bilinmekle beraber, bu durumun serum NP düzeyleri üzerine etkileri konusunda farklı yaş gruplarında (çocuk/erişkin... vb.) yapılacak çalışmalarla yaş ile serum neopterin düzeyi arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda NP düzeylerinin cinsiyet ile değişmediği gösterilmiştir (2,6). **Kaleli ve ark.'nın** (63) 30 KHB'li ,25 hepatit B taşıyıcısı ve 30 sağlıklı erişkini içeren çalışmasında, kadın ve erkek cinsiyet arasında ortalama serum NP düzeylerinde farklılık saptanmamıştır. **Daito ve ark.'nın** (31) KHB'li 11 erkek ve 3 kadından oluşan 14 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, cinsiyetle serum NP düzeylerinde değişiklik olmadığı gösterilmiştir. Çalışmamızda da 22'si kadın ve 42'si erkek cinsiyetten oluşan hastalarda cinsiyete göre serum neopterin düzeylerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0.329$). Çalışmamızın sonuçlarının **Kaleli ve ark.'nın** (63) ve **Daito ve ark.'nın** (31) cinsiyet ve neopterin ilişkisi ile ilgili

çalışmalarıyla benzerlik gösterdiği saptanmış olup, saptadığımız bu sonucun vücutta NP üretimi üzerinde hormonal faktörlerin etkisi olmamasıyla açıklanabileceği düşüncesine varılmıştır.

Yapılan çalışmalarda akut viral hepatitli hastalarda serum NP düzeyleri ile hepatosellüler hasarın en iyi göstergesi olan ALT düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanırken, kronik viral hepatitlerde ALT düzeyleri ile NP düzeyleri arasında ilişki bulunamamıştır (64, 65). **Daito ve ark.'nın** (64) 120 sağlıklı erişkin ve 122' si HBV pozitifliği bulunan 242 hastayı içeren çalışmasında, serum NP ve ALT düzeyleri arasında 12 akut viral hepatit B'li hastada pozitif korelasyon saptanırken, 29 HBsAg taşıyıcısı, 35 kronik hepatit B, 46 HBV'e ikincil KC sirozu, 12 HBV'e ikincil HSK tanılı hastadan oluşan hasta grubunda pozitif korelasyonunun olmadığı gösterilmiştir. Benzer şekilde **Wilmer ve ark.'nın** (23) sirotik ve non-sirotik kronik karaciğer hastalığı olan 264 hasta ile 150 sağlıklı erişkin üzerinde yaptıkları çalışmada, non-sirotik gruptaki 89 hastada serum NP düzeyleri ile serum transaminazları arasında korelasyon saptanmamıştır. Ancak **Gülcan ve ark.'nın** (60) 48 KHB'li, 32 HBV ilişkili KC sirozlu ve 40 sağlıklı çocuk üzerinde yaptığı çalışmada, KHB'li hastalarda serum NP ve ALT düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmış ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.004$). Çalışmamızda ise kronik hepatit B'li hastalarda serum neopterin düzeyleri ile serum ALT düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmış ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.101$). Akut dönemde serum ALT düzeylerinin serum neopterin düzeyleri ile korelasyon göstermesi, serum NP düzeyinin akut dönemde hepatosellüler hasarı göstermede kullanılabilecek bir belirteç olduğu konusunda fikir vermektedir. Ancak kronik hepatit B enfeksiyonunda yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

HBV DNA, aktif viral replikasyonun en iyi belirteçidir ve viral replikasyona karşı gelişen immün yanıt, karaciğerdeki nekroinflamasyonun temel mekanizmasını oluşturmaktadır (39, 50). Ancak yapılan çalışmalarda serum neopterin düzeyi ile serum HBV DNA düzeyi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (60,63). **Kalkan ve ark.'nın** (65) 89 KHB'li hasta ve 40 sağlıklı erişkin üzerinde yaptıkları çalışmada hasta grubunda serum NP düzeyleri ile HBV DNA seviyeleri arasında korelasyon saptanmamıştır. Yaptığımız çalışmada ise serum neopterin düzeyleri ile serum HBV DNA düzeyi arasında pozitif korelasyon saptanmış ancak bu ilişki istatistiksel

anlamli bulunmamıştır (p=0.134). Bu sonuç, neopterinin viral yük miktarını göstermede yetersiz bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir.

Karaciğerdeki nekroenflamasyonun gelişmesinde makrofaj infiltrasyonu söz konusudur ve makrofajlardan salınan neopterinin nekroenflamasyonun bir belirteci olabileceği dşnlmektedir. Bu konuda **Gülcan ve ark.'nın** (60) pediatrik yaş grubunda yaptıkları çalışmada, HAI ile serum neopterin düzeyleri arasında pozitif korelasyon ve istatistiksel anlamlılık saptanmıştır (p=0.001). Ancak **Kalkan ve ark.'nın** (65) erişkin yaş grubunda yaptıkları çalışmada ise, HAI ile serum neopterin düzeyi arasında bir ilişki gösterilememiştir. Yaptığımız çalışmada ise, KHB'li hastalarda serum neopterin düzeyleri ile HAI arasında pozitif korelasyon ve istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmış ve sonuçlarımız, **Gülcan ve ark.'nın** (60) yaptığı çalışmanın sonuçları ile uyumluluk göstermiştir. Bu açıdan hem pediatrik hem de erişkin yaş grubunda serumda neopterin ölçümlerinin karaciğer nekroenflamasyonunun derecesini gösteren bir belirteç olabileceği dşnlmektedir. Ayrıca yaptıımız çalışmada, HAI skorunun 1-4, 5-8 ve 9-13 olarak 3 gruba ayrılarak serum NP düzeyleri ile gruplar arasındaki ilişki incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı fark olduğu ve HAI skoru arttıkça serum NP düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda serum NP düzeyinin ölçümünün kullanılabilirliği ile ilgili olarak, serum NP düzeyi ile HAI skoru ilişkisi formülize edilerek, tasarladıımız bu formül ile serum NP ölçümleriyle nekroenflamasyonun derecesi hakkında fikir edinilebileceği gösterilmiştir.

Literatürde serum NP düzeyinin HAI ile ilişkisini inceleyen çalışmalar bulunmasına karşın, serum NP düzeyinin fibrozis ile korelasyonunun olup olmadığını inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmada serum neopterin düzeyi ile fibrozis skoru arasındaki ilişki incelenmiş, serum NP ile karaciğerdeki fibrozis derecesi arasında pozitif korelasyon olduğu ve bu ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (p=0.001). Karaciğerdeki fibrozis derecesi, klinik göstergeleri, antiviral tedavi seçimini ve tedavi yanıtını etkileyen en önemli faktörlerden biri olması nedeniyle, fibrozis varlığının gösterilmesi ve şiddetinin belirlenmesi önem taşımaktadır. NP, fibrozis gelişimine yok açan makrofajların aktivasyonu ile salgılanması nedeniyle fibrozis varlığını ve şiddetini gösterebilecek bir belirteç olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda serum NP düzeyinin ölçümünün kullanılabilirliği ile ilgili olarak, serum NP düzeyi ile fibrozis

skoru ilişkisi formülize edilerek, tasarladığımız bu formül ile hastaların serum NP düzeyleri ölçülerek fibrozis varlığı ve derecesinin gösterilebileceği saptanmıştır. Çalışmamız literatüre bakıldığında bu konuda yapılan ve bu ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışma olma özelliğini göstermektedir.

Literatürde HBeAg serolojisi ile serum neopterin ilişkisi konusunda çok az çalışmaya rastlanılmıştır. **Kaleli ve ark.'nın** (63) yaptığı 30 HBeAg (+) KHB, 25 HBeAg (-) KHB ve 30 sağlıklı erişkin hastadan oluşan çalışmada HBeAg (+) KHB'li hastalarda HBeAg (-) KHB'li hastalarla kıyaslandığında serum neopterin düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir ($p<0.005$). Yapılan başka bir çalışmada ise 30 HBeAg (+) KHB ve 59 HBeAg (-) KHB'li hasta incelenmiş ve HBeAg (+) olan grupta serum neopterin düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) (65). Çalışmamızda ise HBeAg (+) KHB'li hastalar ile HBeAg (-) KHB'li hastalar kıyaslandığında iki grup arasında serum neopterin düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.664$). Bu sonucun farklı konak immun yanıtına bağlanabileceği ancak çalışmamızda HBeAg (+) hastaların az sayıda olması nedeniyle iki grup arasındaki NP düzeyi farkının ortaya çıkmadığı düşüncesine varılmıştır.

Yaptığımız çalışmada HBeAg (+) KHB'li hastalarda serum ALT değerleri ve serum HBV DNA değerleri ile serum neopterin düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmamış olup ($p=0.820$, $p=0.649$); çalışmamızda HBeAg (-) hastalarda da serum ALT değerleri ve serum HBV DNA değerleri ile serum neopterin düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki gösterilememiştir ($p=0.096$, $p=0.09$). Literatürde hem HBeAg (+) hem HBeAg (-) KHB'li hastalarda yapılan çalışmalarda da serum ALT değerleri ve serum HBV DNA değerleri ile serum neopterin düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (31, 65). Bu sonuç, serum NP'nin KHB'li hastalarda viral yükü ve hepatosellüler hasarı göstermede yetersiz kalabileceğini göstermektedir.

Kalkan ve ark.'nın (65) 30 HBeAg (+), 59 HBeAg (-) KHB'li hasta ve 40 sağlıklı erişkinin dahil ettikleri çalışmada, bu gruplarda serum neopterin düzeyi ile HAI skoru arasındaki ilişki incelenmiş ve serum NP ile HAI skoru arasında pozitif korelasyon saptanmamıştır. Çalışmamızda ise HBeAg (+) hastalarda HBeAg (-) hastalara kıyasla HAI skoru daha yüksek saptanmış olup ($p=0.046$), iki hasta grubu

arasında ortalama serum NP düzeyi açısından istatistiksel bir fark saptanmamıştır ($p=0.664$). Ancak çalışmamızda; hem HBeAg (+) olan grupta hem de HBeAg (-) grupta serum neopterin düzeyleri ile HAI arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.009$, $p=0.002$). Saptadığımız bu sonuç ile serum neopterin düzeyinin hem HBeAg (+) hastalarda hem de HBeAg (-) hastalarda nekroenflamasyon şiddetini yansıtan bir biyobelirteç olduğu düşünülmekle beraber; iki hasta grubu arasında HAI skorları açısından istatistiksel anlamlı fark olmasına karşın, serum NP düzeyleri arasında istatistiksel bir fark bulunmamasının iki grup arasındaki hasta sayısı farkına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Yaptığımız çalışmada HBeAg (+) hastalarla HBeAg (-) hastalar arasında fibrozis skoru açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.264$). Ayrıca iki hasta grubu arasında serum NP düzeyleri açısından istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.664$). Ancak hem HBeAg (+) olan grupta hem de HBeAg (-) grupta serum neopterin düzeyleri ile fibrozis skoru arasında istatistiksel anlamlı fark olduğu gösterilmiştir ($p=0.034$, $p=0.011$). Bu açıdan bakıldığında serumda neopterin düzeyi ile hem HBeAg (+) olan hem de HBeAg (-) KHB'li hastalarda fibrozis derecesi hakkında fikir edinilebileceği düşünülmüştür. Literatürde HBeAg (+) KHB'li hastalarda serum neopterin düzeyi ile fibrozis skoru ilişkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olup, çalışmamız bu konuda yapılmış ilk çalışmadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER:

Kronik hepatit B, kronik karaciğer hastalıklarının dünyadaki en yaygın nedenlerinden biridir. HBV enfeksiyonu, yüksek morbidite ve mortaliteye neden olması nedeniyle önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir. Bu nedenle doğru tanı ve etkin tedavi HBV yönetiminde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Karaciğer biyopsisi en sık uygulanan tanı yöntemlerinden biri olup; komplikasyon gelişme riski 1/4000-1/10.000 arasında değişen invaziv bir işlemdir. Hastaların en fazla korktukları ve kabul etmekte zorlandıkları bir işlem olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum günümüzde karaciğer biyopsisi yerini alabilecek non invaziv belirteçlerin araştırılmasını gündeme getirmiştir.

Neopterin, HBV'de meydana gelen T hücre yanıtı ile açığa çıkan bir sitokin olarak HBV enfeksiyonunda rolü ve diğer parametrelerle ilişkisi ile ilgili yapılmış az sayıda çalışma ile varılmış farklı sonuçlar bulunmaktadır. Bu çalışmada özellikle karaciğer biyopsisi ile saptanan HAI ve fibrozis skoru ile serum neopterin düzeylerinin serolojik göstergelerden bağımsız olarak pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda serum NP düzeylerinin HAI ve fibrozis skoru ile ilişkisini gösteren formüller tasarlanarak, bu formüller ile serum NP ölçümlerinin KHB'li hastaların nekroenflamasyon ve fibrozis derecesini belirlemede klinik kullanımının mümkün olabileceği gösterilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hasta sayımızın az olması, hastalarımızın HAI skorunun en yüksek 13 ve fibrozis skorunun en yüksek 5 olması, çalışmamızın kısıtlılıkları arasında yer almakta olup, daha geniş hasta serilerinde yapılacak ileri çalışmalar ile serum neopterin düzeyinin HAI ve fibrozis skoru ile ilişkisinin daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir.

Son olarak serum neopterin, karaciğerde hepatosellüler hasarın artması sonucu meydana gelen nekroenflamasyonun ve fibrozisin önemli bir göstergesi sayılabileceğini ve HBV seyrinde gelişen doku hasarının şiddetini belirlemede umut vaadeden bir biyobelirteç olarak kullanımının mümkün olduğunu düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR:

1. Hoffmann G, Wirleitner B, Fuchs D. Potential role of immun system activation associated production of NP derivatives in humans. *Inflamm Res* 52: 313-321, 2003.
2. Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Phar Ther* 26: 319-329, 2001.
3. Bilgiç A, Özacar T. Hepatit B Virüsü. In *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M edt. Nobel Tıp Kitapevleri 2008. S:1350-70.
4. Koziel MJ. Immunology of viral hepatitis. *Am J Med* 1996; 100:98-109.
5. Demirturk N, Aktepe OC, Aykin N, Orhan S, Cevik F. Serum neopterin levels in patients with HBV infection at various stages. *Hepatogastroenterology*. 2007; 54(75): 903-5.
6. Hamerlinck FFV. Neopterin: a review. *Exp Dermatol* 1999; 8: 167–176.
7. Murr C, Widner B, Wirleitner B and Fuchs D. Neopterin as a Marker for Immune System Activation. *Current Drug Metabolism*, 2002; 3:175-187.
8. Wachter H, Fuchs D, Hausen A et al. Neopterin as a marker for activation of celluler immunity: immunological basis and clinical application. *Adv Clin Chem* 1989; 27: 81-20.
9. Müller MM, Curtius HC, Herold M, Huber CH. Neopterin in Clinical Practice. *Clinical Chim Acta* 1991;201:1-16.
10. Fuchs D, Weiss G, Wachter H. Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for celluler immune reactions. *International Archives of Allergy and Immunology* 1993; 101: 16.

11. Fuchs D, Weiss G, Reibnegger G, Wachter H. The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious and malignant disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992; 29:307-41.
12. Wirleitner B, Reider D, Ebner S, Bock G, Widner B, Jaeger M. Monocyte-derived dendritic cells release NP. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 1148–1153.
13. Weiss G, Widner B, Zoller H, Schobersberger W, Fuchs D. Immune response and iron metabolism. *Bri J Anaesthesia* 1998; 81: 6-9.
14. Baier-Bitterlich G, Fuchs D, Wachter H. Chronic immune stimulation, oxidative stress and apoptosis in HIV infection. *Biochem Pharmacol* 1997;53: 755–763.
15. Neopterins in clinical medicine. *Lancet* 1988; 1:509-511.
16. Schennach H, Hessenberger G, Mayersbach P, Schonitzer D, Fuchs D. Acute cytomegalovirus infections in blood donors are indicated by increased serum neopterin concentrations. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2002; 191:115-8.
17. Gelderblom HC, Zeuzem S, Weegink CJ, Forestier N, Mcnair L, Purdy S et al. Inflammatory markers neopterin and alanine aminotransferase in HCV patients treated with HCV NS3+4A protease inhibitor telaprevir (VX-950) and/or peginterferon alfa-2a. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2008; 43: 1122-1127.
18. Reibnegger G, Auhuber I, Fuchs D, Hausen A, Judmaier G, Prior C et al. Urinary neopterin levels in acute viral hepatitis. *Hepatology* 1988; 8:771-4.
19. Schennach H, Schoenitzer D, Fuchs D. Association between chronic hepatitis C virus infection and increased neopterin concentrations in blood donations. *Clin Chem* 1998;44: 2225-6.

20. Grungreiff K, Reinhold D, Ansorge S. Serum concentrations of sIL-2R, IL-6, TGF-beta1, neopterin, and zinc in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. *Cytokine* 1999;11:1076-80.
21. Quiroga JA, Martin J, Pardo M, Carreno V. Serum levels of soluble immune factors and pathogenesis of chronic hepatitis C, and their relation to therapeutic response to interferonalpha. *Dig Dis Sci* 1994;39:2485-96.
22. Murr C, Bergant A, Widschwendter M, Heim K, Schröcksnadel H, Fuchs D. Neopterin is an independent prognostic variable in females with breast cancer. *Clin Chem* 1999; 45: 1998-2004.
23. Wilmer A, Nolchen B, Tilg H, Herold M, Pechlaner C, Judmaier G et al. Serum neopterin concentrations in chronic liver disease. *Gut* 1995; 37: 108-112.
24. Ruokonen E, Ilkka L, Niskanen M, Takala J. Procalcitonin and NP as indicators of infection in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46: 398–404.
25. Hausen A, Fuchs D, Reibnegger G. Neopterin in clinical use. *Pteridine* 1989;1:3-10.
26. Yuksekol I, Ozkan M, Akgul O , Tozkoparan E, Al-Rashed M, Balkan A et al. Urinary neopterin measurement as a non-invasive diagnostic method in pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 771-776.
27. Akbulut H, Çelik A, Akbulut P, Yuce P, Kiliç SS. Neopterin level in patients with brucellosis. *J Infect.* 2005; 51(4):281.
28. Reibnegger G, Fuchs D, Grubauer G. Neopterin excretion during incubation period, clinical manifestation and reconvalescence of viral infection, In: Pflaiderer W, Wachter H, Curtius HC (eds). *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*, Berlin-New York: Walter de Gruyter, 1984; 433-447.

29. Schennach H, Mayersbach P, Schönitzer D. Increased prevalence of IgM antibodies to Epstein-Barr virus and Parvovirus B19 in blood donations with above-normal neopterin concentration. *Clin Chem* 1994; 40: 2104-2105.
30. Fuchs D, Jager H, Popescu M, Reibnegger G, Werner ER, Dierich MP et al. Immune activation markers to predict AIDS and survival in HIV-1 seropositives. *Immunol Lett* 1990; 26:75-80.
31. Daito K, Suou T, Kawasaki H: Serum and urinary neopterin levels in patients with chronic hepatitis B treated with interferon. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1994; 83:303-316.
32. Antoniello S, Auletta M, Magri P, Russo N. Serum neopterin levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992;373:1165-1168.
33. Lok AS, McMahon BJ; Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2001 Dec;34(6):1225-41.
34. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virüsünün Moleküler Virolojisi in *Viral Hepatit* 2007. Tabak F, Balık İ, Tekeli E ed. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği* 2007 1. Baskı, S:96-107.
35. Dienstag J. Hepatitis B virüs infection. *New England Journal of Medicine* 2008; 359: 1486-500.
36. Vyas GN, Yen TSB. Hepatitis B virus-Biology, pathogenesis, epidemiology, clinical description, and diagnosis. In: Specter S. *Viral Hepatitis- Diagnosis, Therapy and Prevention*. New Jersey: Humana Press; 1999:35.
37. Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999; 15 (2):373-9.

38. Birengel S, Tekeli E. Kronik Hepatit B de Epidemiyolojik, Virolojik, Fizyopatolojik ve Klinik Özellikler, Tanımlamalar. In Kronik hepatitlerin tedavisinde güncel yaklaşımlar. Köksal İ, Leblebicioğlu H edt. Bilimsel Tıp Yayınevi 2007. S:11-21.
39. Milich DR, Sallberg M, Maruyama T. The humoral immune response in acute and chronic hepatitis B virus infection. Springer Senim İmmuno-pathol. 1995;17: 149–66.
40. Chen WN, Oon CJ, Koh S. Horizontal transmission of a hepatitis B virus surface antigen mutant. J Clin Microbiol 2000; 38 (2):938-9.
41. Özdemir D, Kurt H. Hepatit B Virüs İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi. Viral Hepatit 2007. Tabak F, Balık İ, Tekeli E edt. Viral Hepatitle Savaşım Derneği 2007 1. Baskı, S:108-117.
42. Taşyaran MA. HBV İnfeksiyonu Epidemiyolojisi. In Viral Hepatit 2003. Tekeli E, Balık İ edt. Viral Hepatitle Savaşım Derneği 2003 1. Baskı, S:121-28.
43. Lavanchy D. Epidemiology in Viral Hepatitis. Thomas CH, Lemon S, Zuckerman JA edt. Blackwell Publishing. Third edition. S:181-192.
44. Van Hecke E, Paradijs J, Molitor C et al. Hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute and chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol 1994; 20:514-23.
45. Koziel MJ. Immunology of viral hepatitis. Am J Med 1996; 100: 98-109.
46. Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. Immunology and Cell Biology 2007;85: 16-23.
47. Guidotti LG, Chisari FV. Cytokine-mediated control of viral infections. Virology 2000;273:221-27.

48. Kuruüzüm Z, Ozgenç O, Havuk A, Coşkuner A, Ari A, Celenkoğlu N. Rate of chronicity and time of disappearance of HBsAg following acute hepatitis B. *Hepatogastroenterology*. 2009; 56(90): 466-9.
49. Kantarçeken B. Kronik Hepatit B-Doğal Seyir. In *Viral Hepatit 2009*. Tabak F, Balık İ ed. *Viral hepatitle savaşım derneği 2009*. Birinci Baskı, 3-22.
50. Gitlin N. Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment. *Clinical Chemistry* 1997; 43: 8, 1500–1506.
51. Terrault NA, Wright TL. Viral hepatitis A through G. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH (eds). *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. New York: W.B.Saunders Company; 1998: 1123-55.
52. Hyams K.C. Risk of chronicity following acute hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis*. 1995; 20: 200–206.
53. Huo TI, Wu JC, Lee PC, Chau GY, Lui WY, Tsay SH et al. Sero-clearance of hepatitis B virus surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis. *Hepatology* 1998; 28(1): 2316.
54. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virüs biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64 (1):51-68.
55. Akhan S. Kronik Hepatit B'de Tanı. In *Kronik Hepatitlerin Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar*. Köksal İ, Leblebicioğlu H ed. *Bilimsel Tıp Yayınevi*. 2007, 23-34.
56. Özsan M. HBV infeksiyonunda Mikrobiyolojik Tanı. In *Viral Hepatit 2007*. Tabak F, Balık İ, Tekeli E ed. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği 2007 1. Baskı*, 124-34.

57. Lok AS, McMahon BJ. AASLD Uygulama kılavuzu Kronik Hepatit B. *Hepatology* 2007; 45 (2): 507-539.
58. Elizabeth MB. Grading and Staging the Histopathological Lesions of Chronic Hepatitis: The Knodell Histology Activity Index and Beyond. *Hepatology* 2000; 31: 1.
59. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699.
60. Gulcan EM, Tirit, Anil A, Adal E, Ozbay G. Serum neopterin levels in children with hepatitis-B-related chronic liver disease and its relationship to disease severity. *World J Gastroenterol* 2008; 14(44): 6840-6843.
61. Huang JF, Hsieh MY, Dai CY, Hou NJ, Lee LP, Lin ZY et al. The incidence and risks of liver biopsy in non-cirrhotic patients: an evaluation of 3806 biopsies. *Gut*. 2007; 56(5): 736–737.
62. Lucas RB, Ponsonby AL, Dear K. Mid-life stress is associated with both-up and down-regulation of markers of humoral and cellular immunity. *Stress*, November 2007; 10 (4): 351-361.
63. Kaleli I, Demir M, Cevahir N, Yılmaz M, Demir S. Serum neopterin levels in patients with replicative and nonreplicative HBV carriers. *BMC Infectious Diseases* 2006, 6: 157.
64. Daito K, Suou T and Kawasaki H. Clinical Significance of Serum and Urinary Neopterin Levels in Patients with Various Liver Diseases. *The American Journal of Gastroenterology*. Vol. 87, No.4, 1992.
65. Kalkan A, Ozden M, Akbulut H. Serum Neopterin Levels in Patients with Chronic Hepatitis B. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2005;58;107-109.