



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
GASTROENTEROLOJİ VE HEPATOLOJİ BİLİM DALI

KRONİK HEPATİT B HASTALARINDA HBSAG VE M30-ANTİJEN TİTRE
TAKİBİNİN KLİNİK YARARI

(UZMANLIK TEZİ)

TEZ DANIŞMANI: YARD.DOÇ. DR. MUSTAFA ÇELİK

DR. ZEYNEP DÜNDAR ÖK

DENİZLİ-2016



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
GASTROENTEROLOJİ VE HEPATOLOJİ BİLİM DALI

KRONİK HEPATİT B HASTALARINDA HBSAG VE M30-ANTİJEN TİTRE
TAKİBİNİN KLİNİK YARARI

(UZMANLIK TEZİ)

TEZ DANIŞMANI: YARD. DOÇ. DR. MUSTAFA ÇELİK

DR. ZEYNEP DÜNDAR ÖK

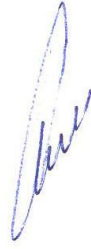
Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 23.05.2014 tarih ve 2016TIPF002 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2016

ONAY SAYFASI

Yard. Doç. Dr. Mustafa ÇELİK danışmanlığında Dr. Zeynep DÜNDAR ÖK tarafından yapılan "KRONİK HEPATİT B HASTALARINDA HBSAG VE M30-ANTİJEN TİTRE TAKİBİNİN KLİNİK YARARI " başlıklı tez çalışması tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN



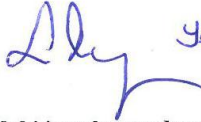
Yard. Doç. Dr. Mustafa Çelik

ÜYE



Yard. Doç. Dr. Adil Coşkun

ÜYE



Yard. Doç. Dr. Serkan Değirmencioğlu

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

.../.../...

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

Doç. Dr. Sahika Fırat AKYER

Dekan a.

Dekan Yardımcısı

TEŐEKKÖR

Tez çalıřmamın oluřmasında ve yűrűtűlmesinde her tűrlű desteęi gűsteren ve deneyimlerini benimle paylařan deęerli hocam ve tez danıřmanım Yard.Doç.Dr.Mustafa ÇELİK'e ve uzmanlık eęitim sűrecimde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım deęerli hocalarıma teőekkűr ederim.

Asistanlık eęitimimde birlikte çalıřmaktan keyif aldığım deęerli asistan arkadaşlarıma ve klinięimizin tűm çalıřanlarına teőekkűr ederim.

Beni bugűnlere getiren, bana olan inançları hiç bitmeyen, her kararında, her yanlıřımda bana destek olan, ne yapsam borcumu űdeyemeyeceğim, kızları olmakla ne kadar řanslı olduęumu bildiğim canım annemle babama; sevgileri ile bana gű ve mutluluk veren meleklerim kız kardeřlerime; her zaman anlayıř ve desteęini yanımda hissettiğim sevgili eřime sonsuz teőekkűrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
ÖZET.....	X
SUMMARY	XII
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Hepatit B Epidemiyoloji.....	2
2.2. Virüsün yapısı.....	3
2.2.1.Genom yapısı.....	4
2.2.2 .Virüsün replikasyonu	5
2.3. HBV enfeksiyonu bulaşma yolları ve bulşma yollarına göre risk grupları...7	
2.4. Kronik Hepatit B nin tanımı.....	8
2.4.1. Kronik Hepatit B nin tanısal kriterleri.....	8
2.4.2. Hastalığın doğal seyri	8

2.5. Tedavinin amacı ve son noktaları	11
2.6. Hepatit B yüzey antijeni.....	12
2.7. M-30 Antijeni.....	13
3.MATERYAL VE METOD.....	15
3.1. Kantitatif serum HbsAg düzeyi ölçümü.....	16
3.2. Serum M30-Antijen düzeyi ölçümü.....	16
3.3. İstatiksel analiz.....	17
4. BULGULAR.....	18
5.TARTIŞMA.....	24
KAYNAKLAR.....	28

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AST: Aspartat Aminotransferaz

ALT: Alanin Aminotransferaz

CCCDNA: Kovalent kapalı sirküler deoksiribonükleik asit

CK: Sitokeratin

DNA: Deoksiribonükleik asit

ELİSA: Enzime linked immunosorbant Assay testi

HAİ: Histolojik Aktivite İndeksi

HBSAG: Hepatit b yüzey antijeni

HBV: Hepatit B Virüsü

HCV: Hepatit C Virüsü

HSK: Hepatocelüler Karsinom

KHB: Kronik Hepatit B

KHC: Kronik Hepatit C

M30: monoklonal antikor-30

NA: Nükleozid/nükleoitit analogu

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

TKAD: Türk Karaciğer Derneği

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tüm hastalarda tedavi öncesi HbsAg ve M30 antijen düzeyleri ile AST, ALT , HAİ , fibrozis ve HBVDNA arasındaki korelasyon analizi.....	18
Tablo 2. Tüm hastalarda tedavi başlangıcı ve tedavinin 6. Ayında saptanan AST, ALT, HBVDNA, HbsAg ve M30 antijen düzeylerinin karşılaştırılması.....	19
Tablo 3. Tablo 3: Lamivudin ve tenofovir grupları arasında tedavi başlangıcında saptanan AST, ALT, HBVDNA, HAİ, Fibrozis, HbsAg ve M30 antijen düzeylerinin karşılaştırılması.....	20
Tablo 4. Lamivudin ve tenofovir gruplarının, tedavi ile AST, ALT, HBVDNA, HbsAg ve M30 antijen düzeylerindeki düşüş oranları açısından karşılaştırılması.....	21

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Dünyada HBV enfeksiyonunun dağılımı.....	3
Şekil 2. Hepatit B virüsünün şematik yapısı.....	4
Şekil 3. HBV'nin replikasyon döngüsü.....	6
Şekil 4. Kronik Hepatit B Enfeksiyon Fazları.....	10
Şekil 5. Lamivudin (lam) ve tenofovir (ten) gruplarında tedavi başlangıcı ve tedavinin 6. ayında HbsAg düzeylerinin düşüş eğrilerinin karşılaştırılması.....	22
Şekil 6. Lamivudin (lam) ve tenofovir (ten) gruplarında tedavi başlangıcı ve tedavinin 6. ayında M30 antijen düzeylerinin düşüş eğrilerinin karşılaştırılması.....	23

ÖZET

Giriş: Antiviral tedavi öncesi ve sonrası serum HBsAg ve cccDNA düzeyleri ve bu değerlerdeki düşüş oranları arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Serum HBsAg düzeyi cccDNA ile ilişkilidir ve enfekte hücrelerin tespitinde cccDNA'nın yerine kullanılabilen bir markır olarak kabul edilmektedir. M30 antijeni apoptozis esnasında kaspazlar tarafından parçalanmış CK 18 düzeylerini ölçmede kullanılır. Apoptozis belirteci olan M30 antijen düzeyleri kronik hepatit B hastalığında karaciğer hasarını gösterir. Bu çalışmada kronik Hepatit B enfeksiyonunun tedavi yanıtının takibinde HbsAg ve M30 antijen titre ölçümünün klinik yararını değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya KHB enfeksiyonuna yönelik oral antiviral tedavi verilen 60 hasta dahil edildi. Tüm hastalarda tedavi başlangıcında saptanan AST, ALT, HBVDNA, HAI, fibrozis ile HbsAg ve M30 antijen düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkisi değerlendirildi. Tedavi başlangıcı ve tedavinin 6. ayında saptanan AST, ALT, HBVDNA, HbsAg ve M30 antijen düzeyleri karşılaştırıldı. Tedavi ile bu değerlerde saptanan düşüş oranları değerlendirildi. Ayrıca hastalar aldıkları tedaviye göre Lamivudin ve Tenofovir alanlar olarak iki gruba ayrıldı. İki grup yaş, cinsiyet, tedavi öncesi saptanan AST, ALT, HBVDNA, HAI, Fibrozis, HbsAg ve M30 antijen düzeyleri açısından karşılaştırıldı. İki grup tedavi öncesi ve sonrası saptanan HbsAg ve M30 antijen düzeylerindeki düşüş oranları açısından karşılaştırıldı.

Sonuçlar: Tedavi başlangıcında saptanan AST, ALT, HBVDNA düzeyleri ile HbsAg ve M30 antijen arasında pozitif korelasyon saptandı ($p<0.001$). HAI, Fibrozis dereceleri ile HbsAg arasında anlamlı ilişki saptanmazken ($p>0.05$), HAI, Fibrozis dereceleri ile m30 antijen düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptandı ($p<0.01$). Tedavi verilen tüm hastalarda tedavinin başlangıcında ve tedavinin 6. ayında saptanan AST, ALT, HBVDNA, HbsAg ve m30 antijen düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü ($p<0.001$). Lamivudin ve Tenofovir grupları arasında HBVDNA düzeylerindeki düşüş oranları açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). Bununla birlikte tedavi ile HbsAg ve m30 antijen düzeylerindeki düşüş

oranları tenofovir grubunda lamivudin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı ($p<0.001$).

Tartışma: HbsAg ve M30 antijen düzeyi ölçümü KHB enfeksiyonu'nun şiddetinin ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılabilir. Tenofovir ile HbsAg ve M30 antijen düzeylerinde düşüşün lamivudin grubuna göre daha belirgin olması, bize KHB enfeksiyonunun en etkin ilaç seçeneği ile tedavisinin hücre ölümü- apoptozisin önüne geçilmesinde etkili olacağını gösterdi. Bu sebeple sadece ALT ve HBVDNA sonuçlarının takibine göre düşük direç bariyeri olan oral antivirallerin kullanımında ısrar edilmesinin yanlış olduğu kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Hepatit B enfeksiyonu, M30 antijen, HbsAg, oral antiviral tedavi

SUMMARY

Introduction: Positive correlation has been detected between pretreatment and posttreatment serologic levels and amount of decrease of HbsAg and cccDNA. Serologic HbsAg level has also been correlated with cccDNA, and serologic HbsAg has been accepted to be a biomarker replacing cccDNA to diagnose infected cells. M30 antigen is used to detect CK 18 levels that are disintegrated by caspase proteins during apoptosis. As an indicator of apoptosis, M30 levels show liver injury in chronic Hepatitis B infection. In this study, we aimed to evaluate clinical efficacy of measurement of HbsAg and M30 titrated antigen levels for response to treatment of chronic Hepatitis B infection during follow-up.

Materials and Methods: Sixty patients receiving oral antiviral therapy for chronic Hepatitis B infection were included in the study. Correlation in between before treatment antigen levels of AST, ALT, HBVDNA, HAI, fibrosis with HbsAg and M30 were evaluated in all patients. Before treatment and at sixth of month of treatment antigen level results of AST, ALT, HBVDNA, HbsAg and M30 were compared. Detected decrement levels following treatment were evaluated. In addition, patients were grouped in two according to medicine received by the patients as Lavumidin and Tenofovir. Two groups were compared concerning age, sex, pretreatment antigen levels of AST, ALT, HBVDNA, HAI, Fibrosis, HbsAg and M30. Two groups were also compared concerning posttreatment decrement ratio of antigen levels of HbsAg and M30.

Results: Positive correlation was detected between levels of AST, ALT, HBVDNA and HbsAg and M30 antigens at pretreatment period measurements ($p < 0.001$). While no significant correlation was detected between HAI, degree of Fibrosis and HbsAg ($p > 0.05$), positive correlation was detected between HAI, degree of Fibrosis and m30 antigen levels ($p < 0.01$). Statistically significant decrements of antigen levels of AST, ALT, HBVDNA, HbsAg and m30 were detected at posttreatment sixth month compared to pretreatment levels in all treated patients ($p < 0.001$). There was no

statistically significant difference between Lamivudin ve Tenofovir groups concerning decrement ratio of HBVDNA levels ($p>0.05$). However, the amount of decrease in antigen levels of HbsAg and m30 was statistically significantly more in Tenofovir group than Lamivudin group ($p<0.001$).

Discussion: Antigen level measurements of HbsAg and M30 can be used to detect severity of chronic hepatitis B infection and to evaluate effectiveness of the treatment. Significant decrease of HbsAg and M30 antigen levels in Tenofovir group in contrast to Lamivudin group showed us that treatment of chronic Hepatitis B infection with the most potent medicine can be effective to avoid cell death-apoptosis. For this reason, we propose that insisting on usage of oral antivirals with low resistance barrier just by observing ALT and HBVDNA results is inadvisable.

Keywords: Hepatitis B infection, M30 antigen, HbsAg, oral antiviral treatment

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ilk keşfedilen hepatit B virüs (HBV) proteinidir ve tespiti hepatit B enfeksiyonu tanısının en temel yoludur (1). Kronik Hepatit B tedavisinin ideal hedefi HBsAg serokonversiyonunun oluşmasıdır (2). Viral persistansın önemli bir göstergesi kovalent kapalı sirküler DNA'dır (cccDNA). cccDNA hepatosit içindeki viral replikasyonu gösterir. Bu nedenle enfekte hücreler için bir gösterge olarak kabul edilir (3).

Antiviral tedavi sonrası cccDNA düzeylerinde azalma kalıcı virolojik yanıt ile ilişkilidir (4). Antiviral tedavi öncesi ve sonrası serum HBsAg ve cccDNA düzeyleri ve bu değerlerdeki düşüş oranları arasında pozitif ilişki saptanmıştır (5).

Serum HBsAg düzeyi cccDNA ile ilişkilidir ve enfekte hücrelerin tespitinde cccDNA'nın yerine kullanılabilir bir markır olarak kabul edilmektedir (5-7) Enfekte hepatositlerin en iyi belirteci cccDNA olmasına rağmen, dokuda kompleks yöntemlerle saptanabiliyor olması nedeni ile kullanımı sadece araştırma merkezleri ile sınırlıdır.

Son yayınlarda HBeAg negatif KHB ve Delta ajanlı KHB enfeksiyonu'nun interferon ve oral antiviral tedaviye yanıtının monitörizasyonunda HBsAg titre ölçümünün faydalı olabileceği belirtilmektedir (8,9)

Kronik hepatit B enfeksiyonu hepatik nekroinflamasyon yolu ile progresif karaciğer hastalığına sebep olabilen önemli bir faktördür (10-12). M30 antijeni apoptozis esnasında kaspazlar tarafından parçalanmış sitokeratin 18 düzeylerini ölçmede kullanılır (13). Apoptoz belirteci olan M30 antijen düzeyleri kronik hepatit B hastalığında karaciğer hasarını gösterir (14).

Bu çalışmada kronik Hepatit B enfeksiyonunun şiddeti ve tedaviye klinik yanıtının değerlendirilmesinde HbsAg ve M30 antijen titre ölçümünün klinik yararını saptamayı amaçladık. HbsAg ve M30 antijen düzeylerindeki değişimin, hastalığın progresyonu ve hastalığa en uygun tedavinin seçimi ile ilgili faydalı bilgiler sağlayabileceğini düşünüyoruz.

2.GENEL BİLGİLER

Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonu halen tüm dünyada önde gelen sağlık sorunlarından biri olup yaklaşık 2 milyar kişi virüsle enfektedir. Dünya genelinde 350-400 milyon kişide kronik HBV enfeksiyonu vardır. HBV akut hepatitten (fulminant hepatite bağlı yetmezlik dahil) kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomaya (HSK) kadar bir dizi karaciğer hastalığına neden olan bir DNA virüsüdür. Her yıl yaklaşık 1 milyon kişi HBV ile ilgili komplikasyonlardan (dekompanse siroz veya HSK) kaybedilmektedir (15,16).

Dünyada yılda beş milyondan fazla akut hepatit B olgusu ortaya çıkmaktadır. Hastalığın karaciğerde yaratacağı hasar kişinin immün cevabına göre değişkenlik gösterir. HBV akut hastalık olarak başlayıp iyileşebilmekte ya da kronikleşebilmektedir. Akut enfeksiyondan sonra yetişkin hastaların % 5'i kronik olarak enfekte kalmaktadır. Akut HBV'de fulminan yetmezlik % 1'den az görülmektedir. Kronik HBV gelişme riski HBeAg pozitif anneden doğan yeni doğanlarda % 90, 5 yaşın altında çocuklarda %25-30 ve yetişkinlerde % 5 den daha azdır (17-22).

2.1. Hepatit B Epidemiyoloji

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



Şekil 1: Dünyada HBV infeksiyonunun dağılımı

Sahra altı Afrika, Asya'nın büyük bir bölümü ve Batı Pasifik'te %8-10, Amazonlar ve Orta ve Doğu Avrupa'nın güneyinde % 2-7, Hindistan ve Orta Doğu'da % 5 , Avustralya, Yeni Zelanda, Kuzey ve BatıAvrupa ve Kuzey Amerika'da % 2 den az görülmektedir. (23-26).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda hepatit B prevalansının batıdan doğuya doğru gittikçe arttığı, Eskişehir, Antalya, Adana, Elazığ, Sivas ve Erzurum'da yüksek oranlarda bulunduğu, Diyarbakır'da HBsAg pozitiflik oranı% 10'lara ulaştığı bildirilmektedir. Kan donör çalışmalarına göre HBsAg pozitifliği ülkemizde yıllar içinde azalma göstermektedir (% 5,2'den % 2,97'ye).

Türk Karaciğer Derneği (TKAD) tarafından yapılan ve 5.471 kişinin tarandığıbir çalışmada HBsAg pozitifliği % 4, anti-HBs pozitifliği % 32, anti-HBc Pozitifliği % 30,6 bulunmuştur. HBsAg pozitif olan hastalarda anti-HBe pozitiflik oranında % 92,1 olarak saptanmıştır (27- 29).

2.2.Virüsün Yapısı

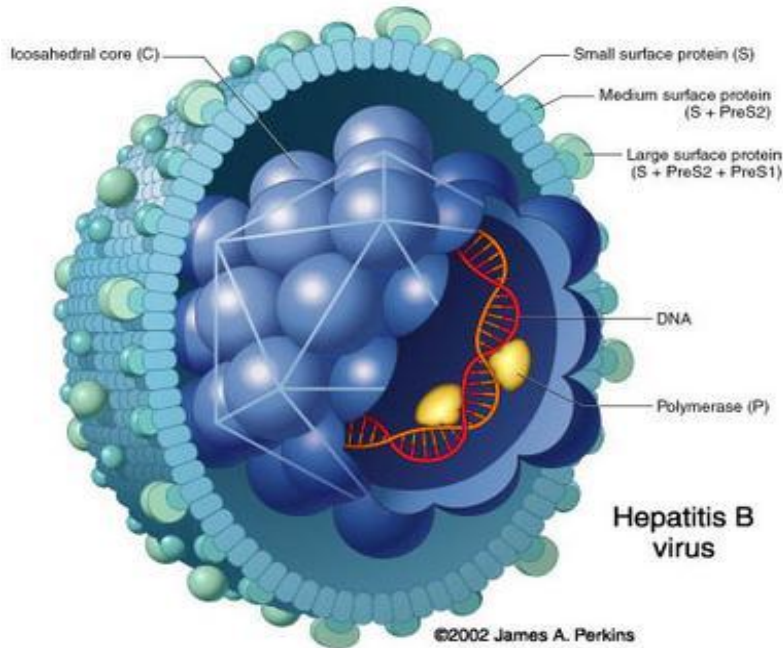
Hepatit B virüsü; *Hepadnaviridae* ailesinin *Orthohepadnavirus* cinsinde yer alan, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA (deoksiribonükleik asit) virüsüdür. Genomik

yapısı nedeniyle bilinen tüm hayvan DNA virüsleri içinde en küçük fakat kendini kodlama kapasitesi en fazla olan HBV, 3200 nükleotidden oluşmaktadır (30,31)

2.2.1. Genom Yapısı

Hepadnaviridae ailesinin üyeleri arasında insanda enfeksiyon oluşturan tek türdür. Zarflı ve 42 nm çapında yuvarlak bir virüs olan HBV hepatotropik bir virüstür (30). HBV ile enfekte hücreler elektron mikroskopunda incelenecek olursa; büyüklük, yapı ve miktar gibi özellikleri bakımından birbirine benzemeyen üç tip partiküle rastlanır:

- 42-47 nm çapında, enfektif özellikte, tam bir virion yapısında, küresel şekilli; Dane partikülleri
- 17-25 nm çapında içinde nükleik asit bulunmayan, enfektif olmayan, HBV yüzey antijeninin farklı formlarını içeren küresel partiküller
- Özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan, 22 nm çapında, 50-500 nm uzunluğunda, nükleik asit içermeyen, enfektif olmayan, tübüler (filamentöz) partiküller



Şekil 2: Hepatit B virüsünün şematik yapısı(32)

HBsAg, bu partiküllerin dış yüzünde eksprese edilir ve kandaki viral partikül titresi $10^4/ml-10^9/ml$ arasında iken, HBsAg subviral partikülleri $10^{13}/ml$ 'ye kadar ulaşabilir (31). Küresel partikül ile tübüler partiküller nükleik asit içermediklerinden enfektif değillerken, Dane partikülü nükleik asit içerdiğinden enfektif özelliğe sahiptir (33).

Dane partikülünün çekirdeğinde bulunan viral genom çember şeklinde ve kısmen çift iplikçikli DNA yapısındadır. Bu parçacığın yüzeyinde konak hücreden kazanılmış olan 7-8 nm genişliğinde lipid zarf bulunur ve viral yüzey antijeni (HBsAg), protein, glikoproteinler ile hücresel lipitleri içerir. Lipid zarfı üzerinde büyük (L), orta (M) ve küçük (S) olmak üzere üç formda viral yüzey antijeni (HBsAg) içerir. L-HBsAg; pre-S1 ve pre-S2 bölgelerini içerirken, M-HBsAg pre-S2'yi içerir. Kor kapsülü ya da kapsid olarak adlandırılan içteki katman ise 27 nm çapında, ikozahedral simetridedir; çekirdek antijeni (HBcAg) ile viral genom ve polimeraz enzimi içerir (30).

2.2.2. Virüsün Replikasyonu

HBV'nin replikasyon kapasitesi oldukça yüksektir. Kronik hepatit B enfeksiyonunda hergün vücutta bulunan virüslerin %50'si yeniden oluşur. HBV sitopatik değildir, tek kanıtlanmış replikasyon bölgesi hepatositlerdir (30). Virüsün hepatosit içine girmesinden salınımına kadar çeşitli aşamalar gözlenir.

1-Virusun hücre içine girmesi ve çekirdekte çift iplikçikli DNA'nın tamamlanması

2-Pregenomik ve subgenomik RNA'ların sentezi

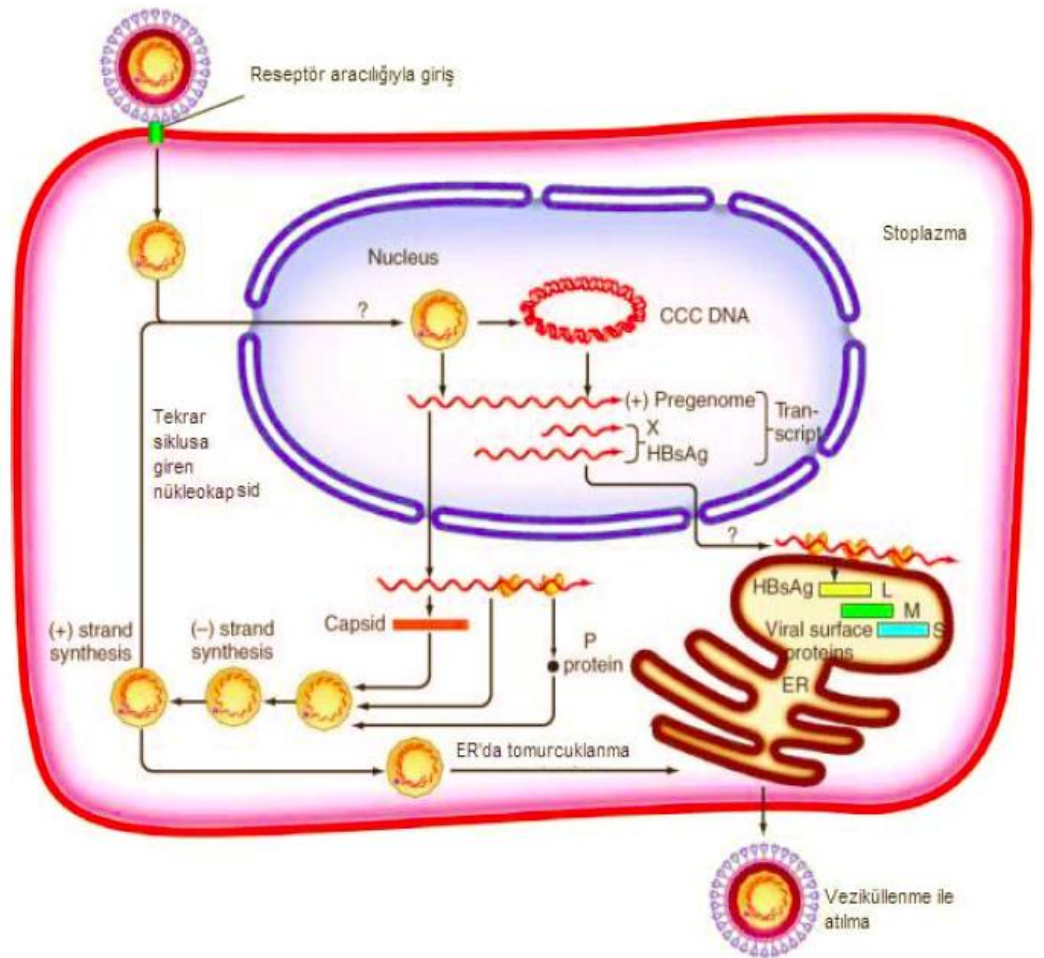
3-Viral kapsidin sentezi ve genomun replikasyonu

4-Diğer viral proteinlerin sentezi

5-Zarfin kazanılması ve hücreden salınma

HBV, bir DNA virusu olmasına karşın "revers transkriptaz" enzimi kodlar ve bu enzim sayesinde RNA aracısı üzerinden replike olur.

Virüs hepatosite penetre olup kılıfından kurtulduktan sonra kısmi çift sarmalın tamamlanacağı hücre nükleusuna taşınır. Bu yapı cccDNA (covalently closed circular DNA)'yı oluşturur. Viral cccDNA, hücre nükleusu içinde yer alacak ve HBV DNA üretimi için kalıp fonksiyonu görecek şekilde mini kromozomlar oluşturur. Viral mini kromozomların transkripsiyonu ve oluşumu tamamen konak hücre enzimlerine bağlıdır. Viral mRNA'lar, translasyonun, replikasyonun ve nükleokapsid oluşumunun gerçekleştiği sitoplazmaya taşınırlar. Olgunlaşmış nükleokapsidler iki yol izler; ya nükleus içine tekrar girerler ya da endoplazmik retikulum içinde kılıf sahibi olarak hücre dışına sekrete edilirler.



Şekil 3: HBV'nin replikasyon döngüsü (31)

HBV, pregenomik RNA (pgRNA) aracılığı ile replike olur. Bu yapı için kalıp görevi gören cccDNA stabil bir yapıdır, hepatosit içinde DNA giraz ve topoizomerazlar ile süpersarmal oluşturarak minikromozom halinde kalır. Hepatosit çekirdeğinde cccDNA rezervuarı, HBV enfeksiyonunun persistansında en önemli

etkendir (34). Hepadnaviral reverstranskriptaz aracılığı ile pgRNA kalıp olarak kullanılarak son ürün olan viral DNA sentezlenir. Diğer viral proteinlerin de senteziyle viral kapsid endoplazmik retikulumdan geçerken yüzey proteinlerini taşıyan zarfla kaplanır. Her üç yüzey proteini de içeren zarflı virüsler Golgi aygıtına taşınır ve burda glikozillenme işlemi tamamlandıktan sonra olgun virionlar veziküler transport ile hücre yüzeyine taşınarak salınırlar.

2.3 HBV İnfeksiyonu Bulaşma Yolları ve Bulaşma Yollarına Göre Risk

Grupları

Perkütan (parenteral) Bulaşma;

Çoğul transfüzyon yapılan hastalar

Hemodiyaliz hastaları

Damar içi uyuşturucu bağımlıları

Dövme (tatuaj) yaptıranlar

Sağlık personeli

Cerrahlar

Dişhekimleri

Hemşireler

Hastabakıcılar

Laboratuvar teknisyenleri

İlk yardım çalışanları

Cinsel Temasla Bulaşma

Erkek eşcinseller

HBV taşıyıcılarının cinsel partnerleri

Hayat kadınları

Çok partnerli heteroseksüeller

Perinatal Bulaşma

HBV taşıyıcısı annelerin bebekleri

Horizontal Bulaşma

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

2.4 Kronik Hepatit B nin Tanımı

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

2.4.1. Kronik Hepatit B'in Tanısal Kriterleri:

a) HBsAg pozitif > 6 ay

b) Serum HBV DNA > 20.000 IU/ml (10^5 kopya/ml), 2.000-20.000 IU/ml (10^4 - 10^5 kopya/ml gibi, daha düşük değerler sıklıkla HBeAg-negatif kronik hepatit B'li hastalarda görülür.)

c) Sürekli ya da intermittantransaminaz yüksekliği

d) Karaciğer biyopsisinde orta veya ileri düzeyde nekroinflamatuvar aktivite, fibrozisin gözlemlendiği kronik hepatit

2.4.2. Hastalığı Doğal Seyri

Kronik HBV enfeksiyonun doğal seyri virüs-konakçı etkileşimine dayanarak; İmmün tolerans, immünlirens, inaktif taşıyıcılık ve HBeAg negatif aktif hastalık olarak dört fazı içermektedir. HBV doğal seyirinde dört faz olmasına rağmen hastaların tümü bu fazların hepsini yaşamayabilir. Hastanın hangi fazları yaşayacağı veya yaşamayacağı genellikle primer HBV enfeksiyonun edinildiği yaşla ilişkilidir.

1-İmmün Tolerans Fazı:

Özellikle doğumda ya da erken çocuklukta alınan enfeksiyonda ortaya çıkmaktadır. Nadiren geç çocukluk ve erişkin dönemde de olabilmektedir. Muhtemelen konakçının immün sisteminin olgunlaşmaması nedeniyle yetersiz immün yanıt ya da intrauterin hayatta anneden geçen HBV antijenlerine karşı gelişen immün tolerans nedeniyle HBV ile infekte hepatositlere karşı yeterli immün yanıt gelişmemektedir. HBV alabildiğince replike olmakta, fakat immün yanıt olmadığı için karaciğerde nekroinflamasyon ve fibrosis gelişmemektedir. Bu safhada HBeAg pozitif, HBV DNA düzeyleri çok yüksek (HBV DNA > 20000 IU/ml) ve transaminaz değerleri normaldir. Bu dönemde karaciğer biyopsisi yapılmasına gerek yoktur; ancak yapılırsa normal ya da minimal aktiviteli hepatit gözlenir, aktif hastalık bulgusuna rastlanmaz. Bu dönem genellikle çok düşük spontan HBeAg serokonversiyonu ile birlikte 10-30 yıl sürmektedir (35-41)

2-İmmün Klirens Fazı:

İmmün sistem matür hale geldikçe adölsan dönem veya erişkin yaşlarda HBV antijenine karşı immünaracılıklıhepatosellüler hasar oluşmaya başlar. Bu dönemde transaminaz düzeyleri yüksek (bazen dalgalı aşırı yükselmeler görülebilir), HBeAg pozitif, HBV DNA yüksek ya da dalgalı seyirli ve karaciğer biyopsisinde aktif inflamasyon bulguları mevcuttur. (42,43). Bu dönemde bazen hastalar asemptomatik olabilirken bazen de semptomatik olup akut hepatiti taklit eden ve fulminan hepatik yetmezliğe gidebilen ataklar ile sonuçlanabilir. HBeAg serokonversiyonu ile birlikte hepatik aktivite remisyona girebilir veya HBV DNA'da geçici azalma ile sonuçlanabilir. Ancak her alevlenme HBeAg serokonversiyonu ve HBV DNA klirensi ile sonuçlanmaz.Bu hastalar intermittant HBV DNA kaybı ile birlikte tekrar tekrar bu durumu yaşayabilirler ve bu da siroz ve HSK gelişim riskini artırır (44,45). Bu dönemde enfeksiyonun alınma yaşına, etnik kökene ve HBV genotipine bağlı olarak değişik oranlarda HBeAg serokonversiyonu meydana gelir.Bu fazın süresi, alevlenmelerin sıklığı ve şiddeti, siroz ve hepatosellüler kanser (HSK) riskini artırmaktadır. HBeAg serokonversiyonu büyük oranda inaktif HBsAg taşıyıcılığına dönüşmektedir. Az sayıda olguda ise kronik hepatit B'ye dönüşür (46,47).

3-İnaktif TaşıyıcılıkFazı:

İmmünklirens döneminin sonunda infekte hücre kitlesi ve virüs replikasyonun azalması ile immün cevabın yatışması sonunda transaminazların normal, virüs replikasyonun çok az, nekroinflamatuvar aktivitenin hafif olduğu bir döneme girilir. İnaktif HBsAg taşıyıcılığında klinik tablo asemptomatiktir. Genellikle ömür boyu sürer ve uzun süreli izlemlerin yapıldığı çalışmalarla prognozun iyi olduğu gösterilmiştir.

İnaktif HBV Taşıyıcılığı Tanısal Kriterleri:

1-HBsAg+ > 6ay veya HBsAg+ / Anti HBcIgM(-)>6ay

2-HBeAg(-), anti-HBe(+)

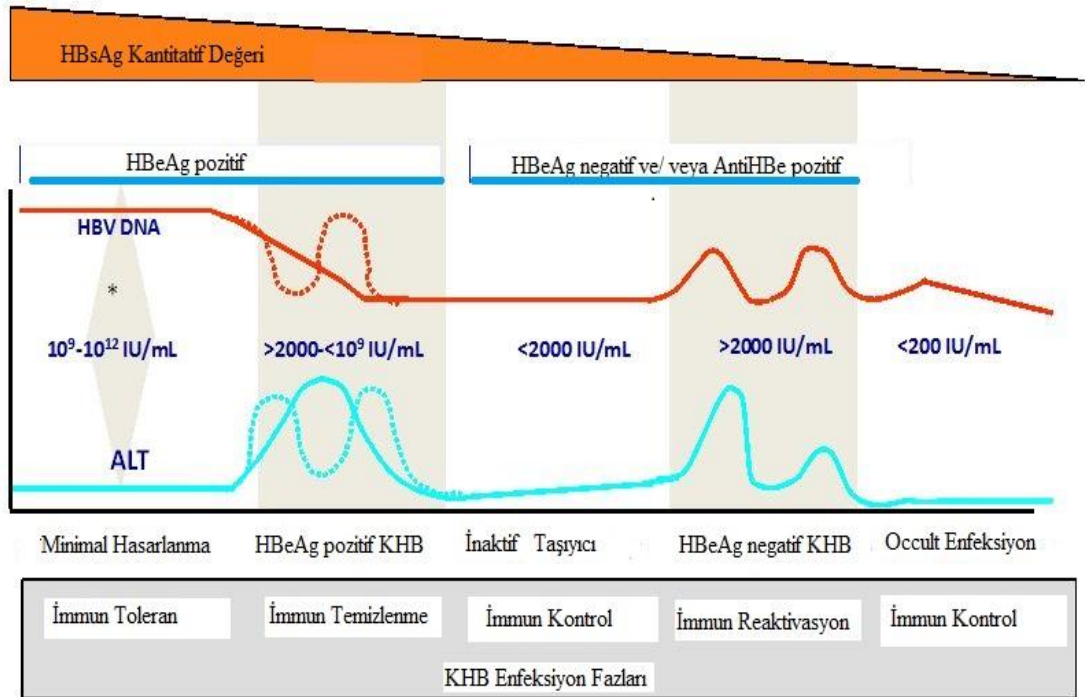
3-Serum HBV DNA <2.000 IU/ml(10^4 kopya/ml)

4-Sürekli normal transaminaz değerleri

5-Yapılırsa karaciğer biyopsisinde normal veya minimal değişiklikler(opsiyonel)

4-Reaksiyon Fazı(HBeAg Negatif Kronik Hepatit B):

İnaktif taşıyıcılık fazı sırasında HBeAg'den anti HBe antikorlarına serokonversiyonu takip eder. Dalgalı seyir gösteren HBVDNA ve aminotransferaz düzeyleri, aktif hepatit bulguları ile seyrederek. Reaktivasyon fazında uzamış hastalık remisyon oranları düşüktür. Bu fazının İnaktif taşıyıcılık fazından ayrılması önemlidir. Çünkü reaksiyon fazındaki hastaların ileri hepatik fibroz, siroz ve bunu takip eden dekompanse siroz ve HCC gibi komplikasyonlar'a kadar ilerleme riski yüksektir (48).



Şekil 4: KHB Enfeksiyon Fazları

5- Gizli (occult) Hepatit B enfeksiyonu:

HBsAg negatifken serum ve karaciğerde HBV DNA pozitif olması durumudur. HCC ve kriptojenik siroz gibi açıklanamayan karaciğer hastalığı olanlarda, spontan olarak

veya interferon tedavisinden sonra iyileşen kronik enfeksiyonlu HBV seropozitif hastalarda ve karaciğer hastalığı bulgusu olmayan hemodiyaliz hastaları, kan vericileri gibi HBV seronegatif kişilerde görülmektedir. Konağın immun sistemi veya viral faktörlere bağlı henüz tam olarak açıklanamamış farklı mekanizmalarla ortaya çıkabileceği düşünülmeyle birlikte en çok öne sürülen mekanizma kaçış mutasyonları olmuştur (49).

2.5.Tedavinin Amacı ve Son Noktaları

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

Kronik HBV enfeksiyonunda tedavinin hedefleri; HBV eliminasyonu veya viral süpresyon; HBeAg serokonversiyonu, HBV DNA negatifleşmesi, HBsAg kaybı, transaminazların normal değerlere inmesi, karaciğerde nekroinflamatuvar aktivitede azalma, hastalığın dekompanse tabloya dönüşmesini, siroz veya HSK gelişmesini engellemektir. Ancak, HBV enfeksiyonu, enfekte hepatositlerin çekirdeğinde cccDNA'nın persistansı nedeniyle tam olarak eradike edilemez. HBV enfeksiyonunda en kalıcı ve en güvenli prognoz göstergesi HBsAg kaybı ve anti- HBs gelişimidir

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

Tedavi HBVDNA düzeyini mümkün olduğunca azaltmalı, ideal olarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tayinlerinin en düşük saptama limitlerinin (10-15 IU/ml) altına indirilmelidir. Bu şekilde sağlanan virolojik baskılama, biyokimyasal remisyona, histolojik düzelmeye ve komplikasyonların önlenmesine

yarar. İnterferon alfa veya nükleosid/nükleotid analoğu (NA) tedavisiyle HBV DNA düzeyinin düşmesi, hastalığın remisyonu ile ilişkilendirilir. NA 'ya karşı direnç riskini azaltmak için HBV DNA'nın saptanamaz düzeylerde sürekli tutulması gerekir. Bu aynı zamanda HBeAg pozitif hastalarda HBeserokonversiyonu şansını ve HBeAg pozitif ve HBeAg negatif hastalarda orta ile uzun vadede HBsAg kaybı olasılığını artırır. Gerçek zamanlı PCR yapılamıyorsa, HBVDNA mümkün olan en hassas tayin ile ölçülmelidir.

HBeAg pozitif ve HBeAg negatif hastalarda ideal tedavi son noktası, AntiHBs'ye serokonversiyon ile veya antiHBs'ye serokonversiyon olmadan sürekli HBsAg kaybıdır. Bu kronik hepatit B aktivitesinin tam ve kesin olarak remisyonu ve uzun vadeli bir sonuç ile ilişkilendirilir. HBeAg pozitif hastalarda, sürekli HBeserokonversiyonutatminkar bir son noktadır. Çünkü iyileşmiş bir prognoz ile ilişkilendirilir. HBeserokonversiyonuna ulaşamayan HBeAg pozitif hastalarda ve HBeAg negatif hastalarda bir sonraki en ideal son nokta NA ile tedavide sürekli saptanamaz HBVDNA düzeyi veya inteferon tedavisinden sonra kalıcı saptanamaz bir HBVDNA düzeyidir (2).

2.6.Hepatit B Yüzey Antijeni

Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ilk keşfedilen hepatit B virüs (HBV) proteinidir ve tespiti hepatit B enfeksiyonu tanısının en temel yoludur (1).

Güncel çalışmalardan elde edilen veriler HBsAg düzeylerinin ölçümünün hastalığın doğal seyrini anlama ve tedaviye yanıtı konusunda yol gösterici olabileceğini işaret etmektedir

Aktif cccDNA'nın translasyonu replikasyon için şablon görevi görür ve konak genomuna integre olan HBVDNA'dan viral genom transkripsiyonu oluşur. Serum HBsAg düzeyi cccDNA ile ilişkilidir ve enfekte hücrelerin tespitinde cccDNA'nın yerine kullanılacak bir markır olarak kabul edilmektedir (50,3). Enfekte hepatositlerin en en iyi belirteci cccDNA olmasına rağmen, dokuda kompleks yöntemlerle saptanabiliyor olması nedeni ile kullanımı sadece araştırma merkezleri ile sınırlıdır.

Günümüzde KHB tanısında kullanılan standart yaklaşım PCR yöntemi ile HBV

DNA düzeyinin ölçümüdür. HBV DNA düzeyindeki düşüş viral replikasyondaki azalmayı işaret eder. Buna karşın HBsAg düzeyindeki düşüş aktif cccDNA'dan üretilen mesajcı RNA'nın translasyonundaki azalmayı işaret eder(3). Bu nedenle HBsAg düzeyi ölçümü bize enfeksiyonun fazının belirlenmesinde yol gösterici olabilir

2.7. M30- Antijen:

Monoklonal antikor (M30) apoptozis esnasında kaspazlar tarafından parçalanmış sitokeratin 18 düzeylerini ölçmede kullanılır. Sitokeratinler epitel hücrelerinin sitoskeletal bileşenleridir (51). Her sitokeratin molekülü spesifik morfolojik veya fizyolojik özelliklere sahip epitel ile ilişkilidir (52). CK18, embriyogenez esnasında ilk eksprese edilen sitokeratindir. Erişkinlerde mesane epiteli, ince barsak ve kolon mukozası , hepatositler, ekrin ter bezleri, follop tüpleri, pankreas asiner hücresi,serviks uteri ve endometriumdan salgılanır (53). CK18 hepatosit içerisinde majör sitoplazmik intermediate filament proteindir. Hepatositin hem nekrozu hem de apoptozu esnasında kana salınır. M30 monoklonal antikor, özellikle CK18 in aspartat 396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanır.

Tüm hepatit türlerinde inflamatuvar olay nekroz ve apoptozu içeren farklı mekanizmalar ile hepatosit ölümüne sebep olur (54-56). Genetik olarak programlanmış olan apoptozis, intrinsik faktörler ile kontrol edilmekle birlikte dışarıdan gelen ekstrinsik sinyaller de hücre zarındaki reseptörler aracılığıyla bu intihar yolunu uyarabilmektedir (57,58). Nekroz ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, ultraviyole ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir (59). Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir (60).

Total (uncleaved) CK18 (M65-antigen), hücreler nekrozisle ölünce dolaşıma salgılanır, kırılmış (caspase-cleaved) CK18 ise apoptozis sırasında oluşur ve hücreler sekonder nekrozise giderken dolaşıma salgılanır (13).

Hepatik fibrozis ile sirkülasyondaki apoptotik CK18 düzeyi arasında ilişki gösterilmiştir. Başarılı bir şekilde hepatit C virus (HCV) klirensi sağlanan hastalarda, hepatosellüler apoptozisde sirkülasyondaki sitokeratin 18 düzeylerinde anlamlı azalmaya bağlı hastalık progresyonu ve fibrozis azalır (12,14). Serum aminotransferaz aktivitesi hepatosellüler nekrozun markırı iken, serum kırılmış CK18 düzeyleri apoptozisin göstergesidir. Serum aminotransferaz düzeyleri ile karaciğer biyopsilerinde ölçülen kaspaz aktivitesi arasında korelasyon bulunmamıştır. Bantel ve ark. 59 kronik viral hepatit C hastasında CK18 düzeyi ile karaciğer hasarı arasında anlamlı ilişki bulmuştur (14). Bu iki markerın kronik hepatit B (KHB) enfeksiyonunda kullanımı ile ilgili çalışma ise sınırlıdır.

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmaya Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji ve Hepatoloji polikliniğine başvuran ve kronik aktif hepatit B (KHB) enfeksiyonu ön tanısı ile karaciğer biyopsisi yapılan, sonrasında oral antiviral tedavi (Tenofovir veya Lamivudin) başlanan 60 hasta dahil edildi. KHB hastaları American Association for the Study of Liver Diseases tarafından yayınlanan guideline kullanılarak tanımlandı (61). Hepatit C, delta hepatiti veya HIV koenfeksiyonu olan hastalar, alkol kullanımı (>40gr/gün) olan hastalar, bilinen malignite öyküsü olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Hastaların yaş ve cinsiyetleri kaydedildi. Hastaların tedavi öncesi yapılan tetkiklerinde saptanan aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), HBV DNA düzeyleri, ayrıca tedavi öncesi karaciğer biyopsisinde saptanan hepatik aktivite indeksi (HAİ) ve fibrozis düzeyleri kaydedildi.

Hastalar takibe alındı ve tedavinin altıncı ayında saptanan AST, ALT, HBVDNA düzeyleri kaydedildi. Tüm hastalardan tedavi başlangıcı ve tedavinin altıncı ayında kan alındı ve hastalardan alınan serum örnekleri santrifüj edildikten sonra -70 derecede saklandı. Çalışma sonunda alınan serum örneklerinden HbsAg ve M30 antijen düzeyleri çalışıldı.

Tüm hastalarda tedavi başlangıcında saptanan AST, ALT, HBVDNA, HAİ, fibrozis ile HbsAg ve M30 antijen düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkisi değerlendirildi. Daha sonra hastaların tedavi başlangıcı ve tedavinin 6. ayında saptanan AST, ALT, HBVDNA, HbsAg ve M30 antijen düzeyleri karşılaştırıldı. Tedavi ile bu değerlerde saptanan düşüş oranları değerlendirildi.

Ayrıca hastalar aldıkları tedaviye göre Lamivudin ve Tenofovir alanlar olarak iki gruba ayrıldı. İki grup yaş, cinsiyet, tedavi öncesi saptanan AST, ALT, HBVDNA, HAİ, Fibrozis, HbsAg ve M30 antijen düzeyleri açısından karşılaştırıldı. İki grup tedavi öncesi ve sonrası saptanan AST, ALT, HBVDNA HbsAg ve M30 antijen düzeylerindeki düşüş oranları açısından karşılaştırıldı.

Çalışma prospektif olarak yapıldı ve her hastadan bilgilendirilmiş onam formları alındı. Çalışma protokolü Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Non - invaziv Klinik Araştırma Etik Komitesi tarafından onaylandı

3.1. Kantitatif Serum HBsAg Düzeyi Ölçümü

Serum HBsAg ölçümü için tüm örneklerden 10 ml venöz kan alındı. Biyokimya tüplerine alınan kanlar hızla laboratuvara gönderildi. Ardından 5000 devir hızında 3 dakika santrifüj edildi ve serumları 2-3 kısım halinde eppendorf tüplerine ayrıldı. Örnekler analiz gününe kadar -70 derecede derin dondurucuda saklandı. Tüm örnekler tek seferde çalışıldı.

HBsAg (Dia.Pro, İtalya) ile yapılan çalışmada öncelikle toplanan bütün örnekler ve kit oda sıcaklığına getirildi. Kullanılan ELISA yöntemi, “fourth generation enzyme “immunoassay” prensibine dayanmaktadır. Çalışmada kitin standart ve kimyasalları hazırlandıktan sonra plakta bulunan kuyucuklara standart ve örnekler konuldu ve 100 µl. enzim konjugat eklendi. Ardından 2 saat 37 °C`de inkübasyon sağlandı. Konjugatın eklenmesinden sonra bütün plaklar wash buffer ile 4-5 kez yıkandı. Bütün plaklara, 200 µl. kromojen substrat eklendi. 30 dakika 18-24 °C`de inkübasyon sağlandı. 100 µl. sülfirik asit her bir kuyucuğa eklenerek örneklerin renklenmesi sağlandı. Renk oluşumu gözlendikten sonra 450 nanometrede (nm.) Kayto RT – 2100c Microplate reader ELISA cihazı ile kuyucukların absorbans değerleri okundu ve sonuçların çıktısı alındı. Bulunan serum absorbans değerleri kullanılarak konsantrasyonlar hesaplandı. Bulunan değerler HBsAg için IU/L. şeklindedir.

3.2 Serum M30-antijen düzeyi ölçümü

Serum M30 antijen düzeyleri Human Cytokeratin 18-M30 (AP-M30 Bioassay Technology Laboratory) kiti kullanılarak enzim bağlı immunosorbent deneyi (ELISA) yöntemi ile ölçüldü. M30 antijen titreleri 5 IU/L-900 IU/L ölçüm aralığında verildi.

AP-M30 için spesifik antikorlar plakalara yerleştirildi. Kitin standart ve kimyasalları hazırlandıktan sonra plakta bulunan kuyucuklara standart ve örnekler konuldu. Mevcut AP-M30 ile antikorlar bağlandı. Kalan bağlanmamış örnekler çıkarıldıktan sonra AP-M30 için spesifik biyotin ile konjuge edilmiş antikor eklendi. Yıkamadan sonra horseradish heroxidase ile konjuge edilmiş streptovisin (HRP) eklendi. Antikor bağlı AP-M30 miktarı ile orantılı olarak renk değişimi gözlemlendi. Renk değişimi gözlemlendikten sonra renk yoğunluğu ölçüldü.

3.3. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bağımlı grup karşılaştırmalarında, parametrik test varsayımları sağlandığında İki eş arasındaki farkın önemlilik testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanıldı. Sürekli değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde Spearman korelasyon katsayısı kullanıldı. <0.05 'den küçük P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji ve Hepatoloji polikliniğine KHB enfeksiyonu ön tanısı ile başvuran ve sonrasında oral antiviral tedavi başlanan 60 hasta dahil edildi. Hastaların 34 'ü kadın (%56,7) ve 26 'sı erkek(%43,3) olup yaş ortalaması 46 ± 10.7 (yıl) idi. Hastaların 30 'u lamivudin tedavisi (%50), 30 'u (%50) tenofovir tedavisi kullanmakta idi.

Öncelikle çalışmaya alınan tüm hastalarda, tedavi başlangıcında saptanan AST, ALT, HBVDNA, HAİ, fibrozis düzeyleri ile HbsAg ve m30 antijen düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkisi değerlendirildi. Tedavi başlangıcında saptanan AST, ALT, HBVDNA düzeyleri ile HbsAg ve M30 antijen arasında pozitif korelasyon saptandı. HAİ, Fibrozis dereceleri ile HbsAg arasında anlamlı ilişki saptanmazken, HAİ, Fibrozis dereceleri ile m30 antijen düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptandı (Tablo 1).

Tablo 1: Tüm hastalarda tedavi öncesi saptanan HbsAg ve m30 antijen düzeyleri ile AST, ALT, HAİ, fibrozis ve HBVDNA düzeyleri arasındaki korelasyon analizi

	HbsAg (IU/L)	M30 (IU/L)
AST (IU/ml)	$p<0.0001$, r: 0.533	$p<0.0001$, r: 0.590
ALT (IU/ml)	$p<0.0001$, r: 0.503	$p<0.0001$, r: 0.491
HBVDNA (kopya/ml)	$p<0.0001$, r: 0.831	$p<0.0001$, r: 0.522
HAİ	$p>0.05$, r: 0.174	$p<0.0001$, r: 0.534
Fibrozis	$p> 0.05$, r:0.135	$p<0.01$, r: 0.174
HbsAg (IU/L)		$p<0.01$, r: 0.411

Sonrasında tedavi verilen tüm hastalarda tedavinin başlangıcında ve tedavinin 6. ayında saptanan AST, ALT, HBVDNA, HbsAg ve m30 antijen düzeylerindeki düşüş karşılaştırıldı. Tedavi verilen tüm hastalarda değerlendirilen tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü (Tablo 2).

Tablo 2: Tüm hastalarda tedavi başlangıcı ve tedavinin 6. ayında saptanan AST, ALT, HBVDNA, HbsAg ve m30 düzeylerinin karşılaştırılması

	0.ay	6.ay	p value
	ortalama ± std sapma	ortalama ± std sapma	
AST (IU/ml)	46,47 ± 42,05	24,43 ± 7,86	p<0,0001
ALT (IU/ml)	57,47 ± 73,28	27,65 ± 17,99	p<0.0001
HBVDNA (Kopya/ml)	12607824,03 ± 27434892,28	767,07 ± 1607,81	p<0,0001
HbsAg (IU/L)	14855,9 ± 3226,47	11762,55 ± 2709,78	p<0,0001
M30 antijen (IU/L)	325495,5 ± 69704,39	261507,72 ± 40243,5	p<0,0001

Hastalar lamivudin ve tenofovir tedavisi alanlar olarak iki gruba ayrıldı ve iki grup tedavi öncesi saptanan AST, ALT, HBVDNA, HAİ, Fibrozis, HbsAg ve m30 antijen düzeyleri açısından karşılaştırıldı. Tenofovir tedavisi verilen grupta lamivudin tedavisi verilen gruba göre tedavi öncesi saptanan AST, ALT, HBVDNA, HAİ, Fibrozis, HbsAg ve m30 antijen düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı (Tablo 3)

Tablo 3: Lamivudin ve tenofovir grupları arasında tedavi başlangıcında saptanan AST, ALT, HBVDNA, HAİ, Fibrozis, HbsAg ve M30 antijen düzeylerinin karşılaştırılması

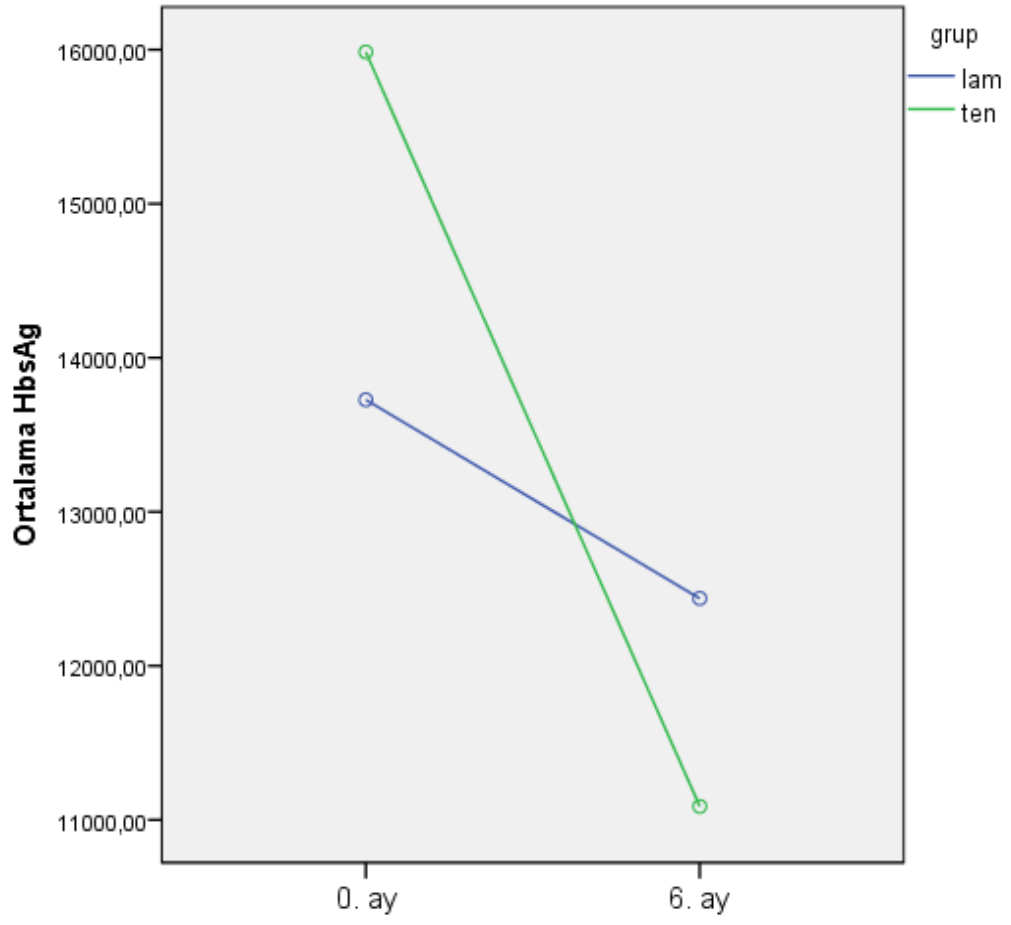
	Lamivudin grubu (ortalama ± std sapma)	Tenofovir grubu (ortalama ± std sapma)	P değeri
AST (IU/ml)	28,93 ± 14,31	64 ± 52,5	P<0,001
ALT (IU/ml)	31,23 ± 20,22	83,7 ± 95,35	P<0,001
HBVDNA (Kopya/ml)	1439220,23 ± 4808449,24	23776427,83 ± 35356776,92	P<0,01
Fibrozis	2,33 ± 1,15	3,17 ± 1,12	P<0,01
HAİ	8,4 ± 1,81	9,8 ± 2,49	P<0,01
HbsAg (IU/L)	13726,83 ± 3164,35	15984,97 ± 2920,37	P<0,01
M30 Antijen (IU/L)	296092,17 ± 46446,31	354898,83 ± 77064,58	P<0,001

Lamivudin ve Tenofovir grupları, tedavi sonunda AST, ALT, HBVDNA, HbsAg ve m30 antijen düzeylerindeki düşüş oranları açısından karşılaştırıldı ve iki grup arasında HBVDNA düzeylerindeki düşüş oranları açısından anlamlı fark saptanmadı. Bununla birlikte tedavi ile AST, ALT, HbsAg ve m30 antijen düzeylerindeki düşüş oranları tenofovir grubunda lamivudin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı (tablo 4).

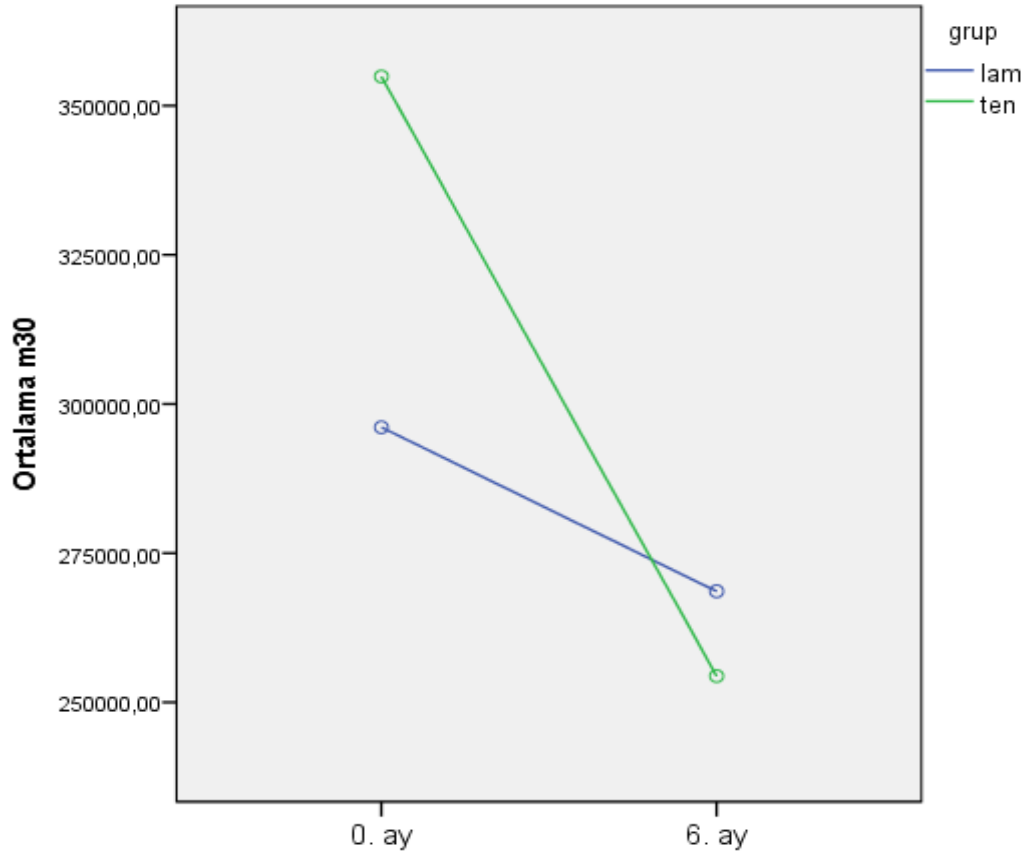
Tablo 4: Lamivudin ve tenofovir gruplarının, tedavi ile AST, ALT, HBVDNA, HbsAg ve m30 antijen düzeylerindeki düşüş oranları açısından karşılaştırılması.

	Lamivudin grubu (ortalama \pm std sapma)	Tenofovir grubu (ortalama \pm std sapma)	P değeri
AST (IU/ml)	0,18 \pm 46,78	-41,14 \pm 37,74	P<0,001
ALT (IU/ml)	3,35 \pm 67,41	-33,55 \pm 48,49	P<0,05
HBVDNA (Kopya/ml)	-98,23 \pm 6,96	-99,37 \pm 3,25	p>0,05
HbsAg (IU/L)	-9,49 \pm 5,8	-30,62 \pm 5,58	P<0,001
M30 antijen (IU/L)	-9,16 \pm 4,71	-27,04 \pm 8,26	P<0,001

Lamivudin (lam) ve tenofovir (ten) gruplarında tedavi başlangıcı ve tedavinin 6. ayında HbsAg ve m30 antijen düzeylerinin düşüş eğrileri incelendiğinde tenofovir grubunda lamivudin grubuna göre her iki parametredeki düşüşünde istatistiksel olarak daha belirgin olduğu görüldü (şekil 5,6).



Şekil 5: Lamivudin (lam) ve tenofovir (ten) gruplarında tedavi başlangıcı ve tedavinin 6. ayında HbsAg düzeylerinin düşüş eğrilerinin karşılaştırılması



Şekil 6: Lamivudin (lam) ve tenofovir (ten) gruplarında tedavi başlangıcı ve tedavinin 6. ayında M30 antijen düzeylerinin düşüş eğrilerinin karşılaştırılması

5.TARTIŞMA

Biz bu çalışmada kronik aktif hepatit B enfeksiyonu'nun şiddetinin tayini, ayrıca bu grupta oral antiviral ilaçların etkinliği ve tedavi takibinde HbsAg ve M30 antijen düzeylerininin faydalı birer marker olarak kullanılabileceğini göstermeyi amaçladık.

Serum HbsAg düzeyinin kronik hepatit B fazlarına göre değiştiği gösterilmiştir (62,63). Kantitatif hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) düzeyi dolaylı olarak karaciğer dokusunda HBV cccDNA seviyesini yansıtabilir (64,65). Çalışmamızda HbsAg düzeyi ile HBVDNA düzeyi arasında pozitif korelasyon saptadık. Ayrıca HbsAg ile AST ve ALT düzeyleri arasındada pozitif korelasyon saptadık.

Genotip B ve C ile enfekte HbeAg pozitif hastalarda şiddetli karaciğer fibozisinin düşük serum HbsAg ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (66). Fakat bizim çalışmamızda HbsAg ve AST, ALT arasında anlamlı ilişki varken, HbsAg ile HAİ ve fibrozis arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Bu durumun hasta grubumuzda yalnızca ciddi fibrozisi olan hastaların değil erken evre fibrozisli hastalarında bulunmasından kaynaklandığını düşünüyoruz.

Serum ALT düzeyleri genellikle klinik rutinde karaciğer inflamasyonunda belirteç olarak kullanılır, ancak apoptoz ile gerçekleşen hücre ölümünde ALT düzeylerinin yeterli bilgi vermediği gösterilmiştir (11,12).

Serum M30 - antijen düzeylerinin non alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve kronik viral hepatit dahil olmak üzere birçok kronik karaciğer hastalığında karaciğer hasarının derecesini değerlendirmek için kullanıldığı gösterilmiştir (67-69).

Yapılan çalışmalarda M30-antijen düzeyinin non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, kronik hepatit C, kronik hepatit B ve ilaçlara bağlı karaciğer hasarında hastalık şiddetini yansıtan hepatosit biyomarkırı olması ile birlikte etyolojileri ayırt etme ve prognoz hakkında bilgi sağlayabileceği bildirilmiştir (70-73)

Serum M30 antijen seviyesinin kronik hepatit B enfeksiyonunda apoptotik aktiviyeti gösterdiği rapor edilmiştir (70). Kronik hepatit C'li hastalarda, M30-antijen düzeyleri ve fibrozis arasında bir korelasyon defalarca bildirilmiştir (11,74).

Farnika H ve arkadaşları KHB hastalarında M30 antijen düzeyleri ile fibrozis arasında pozitif korelasyon saptarken ALT aktivitesi ile fibrozis arasında korelasyon olmadığını göstermişlerdir (75). Anna K ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise kronik hepatit C enfeksiyonunda M30-CK18 serum konsantrasyonunun transaminaz aktivitesinin yanı sıra inflamatuvar aktivite ve karaciğer fibrozisi ile anlamlı ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir (76).

Yağmur ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda kronik inflamatuvar karaciğer hastalıklarında etyolojiden bağımsız olarak serumda yüksek M30-CK18 konsantrasyonları gösterilmiştir. Daha da önemlisi, serum M30-CK18 düzeyi ile karaciğer hasarı, karaciğer yetmezliği ve ALT aktivitesi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (77). Zhujun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HBV-DNA ve M30-antijen düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır (78).

Serum M30 antijen düzeyi karaciğer nekroenflamasyonu ile ilişkilidir ve serum M30 antijen düzeyi ile AST düzeyinin birlikte ölçümü kronik hepatit B hastalarında inflamasyon şiddetinin tespitinde faydalı olabileceği bildirilmiştir (79).

Çalışmamızda aktif KHB enfeksiyonunda karaciğer biyopsisinde HAİ ve fibrozis ile M30 antijen düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğunu gösterdik. Bu hasta grubunda M30 antijen düzeyi ile AST ve ALT arasında da anlamlı düzeyde pozitif korelasyon olduğunu saptadık. Bu bize özellikle antihbe pozitif aktif KHB gibi seçilmiş bir hasta grubunda M30 antijen düzeyi ölçümünün karaciğer hasarını öngörmeye oldukça faydalı olabileceğini düşündürdü. Bu sebeple M30 antijen düzeyinin KHB enfeksiyonunun aktivitesinin tayininde oldukça faydalı bir marker olabileceğini düşünüyoruz.

Günümüzde KHB tedavisinde lamivudin, telbivudin, adefovir gibi düşük direnç bariyeri olan oral antivirallerin yanında, tenofovir ve entekavir gibi yüksek direnç bariyerine sahip oral antiviraller kullanılmaktadır. Nükleoz(t)id analogu (NA) tedavisinin amacı tedavi boyunca viral supresyonun sağlanmasıdır (80). Tedaviden

beklenen en optimal sonuç, tedavinin güvenle kesilebileceği tek durum olan HbsAg kaybıdır, ancak bu hedefe çok nadir ulaşılabilmektedir (81).

NA tedavisi ile HBV replikasyonunun uzun süreli supresyonunun karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinoma gelişme riskini azalttığı bilinmektedir (82,83). Bu sebeple bu hastaların tedavisinde mümkün olan en etkin seçeneğin kullanılması gerekmektedir. Günümüzde KHB enfeksiyonunun tedavisinin takibi yaygın olarak aminotransferazlar ve HBVDNA düzeyi ölçümü ile yapılmaktadır. Ancak bu parametrelerin tedavi etkinliğini değerlendirmedeki yeri tartışmalıdır.

NA tedavisine rağmen hepatit B virüsünün persistantının devam etmesinin nedeni enfekte hücrelerde cccDNA'nın varlığıdır (6,84). HbsAg düzeylerinin covalently closed circular(ccc) DNA ile ilişkili olduğu raporlanmıştır (5).

Son çalışmalar antiviral tedavi öncesi ve sonrası HBsAg düzeyi ve cccDNA arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu göstermiştir (85,86). Bizim çalışmamızda da tedavi öncesi Hbs ag ve HBVDNA düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptadık. Ayrıca tedavi ile HbsAg ve HBVDNA düzeylerinde birbirine paralel, istatistiksel olarak belirgin düzeyde anlamlı düşüş saptadık. Bu bize bu hasta grubunda HbsAg düzeyi ölçümünün tedavi takibinde faydalı bir parametre olarak kullanılabileceğini düşündürdü.

Daha da önemlisi tenofovir alan grupta lamivudin alan gruba göre HBVDNA düzeylerindeki düşüş oranları açısından anlamlı fark saptamadık. Ancak tenofovir grubunda lamivudin grubuna göre HbsAg düzeylerindeki düşüş istatistiksel açıdan belirgin düzeyde fazlaydı. Bu sebeple KHB enfeksiyonunda HBVDNA takibi ile düşük direnç bariyeri olan oral antivirallerin kullanılmasına devam edilmesinin uygun olmayacağı sonucuna vardık.

İnflamatuar olaylar apoptoz ve nekroz olmak üzere bir çok mekanizma ile hepatosit ölümüne neden olur (54-56). Kronik hepatit B hastalarında antiviral tedavinin en önemli hedefi nekroinflamatuvar aktivitenin azalmasıdır (75).

Bantel ve arkadaşları kronik HCV enfeksiyonunda erken karaciğer hasarının tespiti için M30 antijen düzeyleri ile aminotransferaz düzeylerini karşılaştırdıklarında M30 düzeylerinin daha hassas bir belirteç olabileceğini

göstermişlerdir (14). Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da kronik HCV enfeksiyonu olan hastalarda serum M30 - antijen düzeyleri ve AST arasında anlamlı düzeyde pozitif ilişki bildirilmiştir (87).

M30 antijen düzeylerinin antiviral tedaviden sonra değiştiği gözlenmiştir. Bu, M30 antijen düzeylerinin HBV-DNA düşüş ile eş zamanlı olarak azaldığını gösteren diğer çalışmaların bulguları ile desteklenmektedir (88-90). NA tedavisi ile M30 antijen ve ALT düzeylerinin birlikte azaldığı gösterilmiştir (75).

Çalışmamızda kronik aktif hepatit B hastalığında M30 antijen düzeyleri ile hem AST hemde ALT düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptadık. Bunun yanında tedavi ile M30 antijen, AST, ALT HBVDNA düzeylerinde birbirine paralel olarak istatistiksel açıdan yüksek düzeyde anlamlı düşüş olduğunu gösterdik. Apoptosis markerı olan M30 ile nekrozun göstergesi olarak kabul edilen ALT düzeylerininin tedavi ile anlamlı düzeyde düşmesi ve HBVDNA da buna paralel düşüş olması bize M30 antijen düzeylerininin tedavi takibinde kullanılabileceğini düşündürdü. Bu sebeple M30 antijen düzeyi ölçümü hastalık şiddetini değerlendirmenin yanında tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi ve tedavi takibinde de kullanılabilecek bir markerdir.

Ayrıca çalışmamızda HbsAg, AST, ALT ve m30 antijen düzeylerindeki düşüş, potent oral antiviral olan tenofovir alan hasta grubunda, lamivudin alan hasta grubuna göre daha belirgindi. Bu iki grup arasında HBVDNA düşüş oranında anlamlı fark saptanmamasına rağmen, tenofovir grubunda, lamivudin grubuna göre cccDNA'nın indirek göstergesi olan HbsAg titresinde ve apoptozisin göstergesi olan m30 antijen titresinde belirgin düşüş olması oldukça anlamlı bir bulguydu. Maalesef ülkemizde dahil, pek çok ülkede sosyoekonomik sebeplerden dolayı düşük direnç bariyeri olan oral antivirallerin kullanımına devam edilmektedir. Bu bilgi ışığında, günümüz de hala direnç bariyeri düşük olan oral antivirallerin HBVDNA düzeyiyle takip edilerek kullanılmaya devam edilmesinin yanlış olduğunu düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A ‘‘New’’ antigen in leukemia sera. JAMA 1965;191:541-546)(Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. HEPATOLOGY 2009;50:661-662 .
2. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. J Hepatol 2009;50:227-242.
3. Brunetto MR. A new role for an old marker, HBsAg. J Hepatol 2010;52:475-477.
4. Sung JJ, Wong ML, Bowden S, Liew CT, Hui Ay, Wong VW, et al. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy. Gastroenterology 2005;128:1890-1897 .
5. Chan HL, Wong VW, Tse AM, Tse CH, Chim AM, Chan HY, et al. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. Clin Gastroenterol Hepatol 2007;5:1462-1468.
6. Werle-Lapostolle B, Bowden S , Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. Gastroenterology 2004;126:1750-1758.
7. Volz T, Lutgehetmann M, Wachtler P, Jacob A, Quaas A, Murray JM, et al. Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients. Gastroenterology 2007; 133:843-852.
8. Manesis EK, Schina M, Le Gal F, Agelopoulou O, Papaioannou C, Kalligeros C, et al. Quantitative analysis of hepatitis D virus RNA and hepatitis B surface antigen serum levels in chronic delta hepatitis improves treatment monitoring. Antivir Ther 2007;12:381-388.
9. Manesis EK, Hadziyannis ES, Angelopoulou OP, Hadziyannis SJ. Prediction of treatment-related HBsAg loss in HBeAg negative chronic hepatitis B: a clue from serum HBsAg levels. Antivir Ther 2007;12:73-82.

10. McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* . 2009;49:S45-S55.
11. Kronenberger B, Zeuzem S, Sarrazin C, Mihm U, von Wagner M, Hofmann WP, et al. Dynamics of apoptotic activity during antiviral treatment of patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther*. 2007;12:779-778.
12. Kronenberger B, Wagner M, Hermann E, Mihm U, Piiper A, Sarrazin C, et al. Apoptotic cytokeratin 18 neoepitopes in serum of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2005;12:307-314.
13. Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, Nap M, Maurmann J, Steiner G. Et.al. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18, *Cancer Res*, 2004;64:1751-56
14. Bantel H, Luger A, Heidemann J et al. Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology* 2004;40:1078-1087
15. Lavanchy D. Hepatitis B epidemiology, disease burden, treatment and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004;11(2):97-107.
16. Liang TJ. Hepatitis B: The virus and disease. *Hepatology*. 2009; 49(5 suppl): S13-21
17. Gish RG, Locarnini S. Chronic hepatitis B. *Viral Infection*, in Yamada T (ed): *Textbook of Gastroenterology*, Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK. (2009).
18. Beasley RP, Hwang LY, Lee GC et al. Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B virus infections with hepatitis B immunoglobulin and hepatitis B vaccine. *Lancet*. 1983; 2(8359):1099-102.
19. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, et al. Incidence of hepatitis B virus infections in preschool children in Taiwan. *J Infect Dis* 1982; 146(2):198-204.

20. Coursaget P, Yvonnet B, Chotard J et al. Age- and sex-related study of hepatitis B virus chronic carrier state in infants from an endemic area (Senegal). *J Med Virol* 1987; 22(1):1-5.
21. McMahon BJ, Alward WL, Hall DB et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis* 1985; 151(4):599-603.
22. Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Sjogren MH, Roumeliotou-Karayannis A, Gerin JL, Purcell RH. Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in Greek adults. *Gastroenterology* 1987; 92(6):1844-1850.
23. McMahon BJ. Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis.* 2005; 25(Suppl1):3-8
24. Mast EE, Alter MJ, Margolis HS. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine*. 1999; 17(13-14):1730-3.
25. Weinbaum CM, Williams I, Mast EE, et al. Recommendations for identification and public health management of person with chronic hepatitis B virus infection. *MMWR Recomm Rep* 2008; 57:1-20.
26. Bielawski KP, Stalke P. Molecular epidemiology of chronic hepatitis B virus infection in northern Poland. *J Clin Virol* 2005; 34 (suppl1) :63-9.
27. Mistik R. Ülkemizde kronik viral hepatitlerin epidemiyolojisi. *Klinik Dergisi*; 2007; 20 (özel sayı 1):61-3.
28. Tözün N, Özdoğan OC, Çakaloğlu Y, İdilman R, Karasu Z, Akarca US, Kaymakoglu S, Ergönül Ö. A nation wide prevalence study and risk factors for hepatitis A, B, C and D infections in Turkey. The 61st Annual meeting of the

American Association for the study of liver diseases. (AASLD) Oct29-Nov2 2010, Boston.(Poster presentation, No. 789).

29. Karaaslan H, Yurdaydin C. Viral hepatitis at the Black Searegion: the problem of viral hepatitis in Turkeyrevisited. Turk J Gastroenterol. 2009; 20: 1-2.

30. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3.Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2008.

31. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Eighth Edition (2015) Eds: John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. ISBN:13-978-1-4557-4801-3, Elsevier Saunders.

32. <http://microbiology2009.wikispaces.com/hepatitis+B> erişim 23.09.16

33. Tasyaran MA. HBV Enfeksiyonu Epidemiyolojisi. İn: Tekeli E, Balık İ, eds. Viral Hepatit 2003, Ankara, Viral Hepatitle Savaşım Derneği,2003:121-128.

34. Jilbert AR, Burrell CJ, Triatni M, Kann M. Hepatitis B Virus Replication. In: Lai CL, Locarnini S, eds. Hepatitis B Virus, London: International Medical Press; 2002:43-53

35. Chang MH, Hsu HY, Hsu HC, Ni YH, Chen JS, Chen DS. The significance of spontaneous hepatitis e antigen seroconversion in childhood: with special emphasis on the clearance of hepatitis e antigen before 3 years of age. Hepatology 1995; 22:1387-92

36. Chu CM, Karayiannis P, Fowler MJ, Monjardino J, Liaw YF, Thomas HC. Natural history of chronic hepatitis B virüs infection in Taiwan: studies of hepatitis B virüs DNA in serum. Hepatology. 1985; 5:431-434.

37. Hsu HY, ChangMH, Hsieh KH, et al. Cellular immune response to HBcAg in mother-to –infant transmission of hepatitis B virus. *Hepatology*.1992; 15:770-776
38. Chen M,Sallberg M, HughesJ,et al. Immune tolerance split between hepatitis B virüs precore And core proteins. *J Virol*. 2005; 79:3016-3027.
39. Chang MH, Hwang LY, Hsu HC, Lee CY, Beasley RP. Prospective study of asymptomatic HBsAg carrier children infected in the perinatal period: clinical and liver histologic studies. *Hepatology*1988; 8:374-377
40. Lok AS, Lai CL. A longitudinale follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antijen-positive Chinese children. *Hepatology*. 1988; 8:1130-1133.
41. McMahon BJ, Holck P, Buldkow L, Snowball M. Serologic and clinical outcomes of 1536 Alaska Natives chronically infected with hepatitis B virus. *AnnInternMed*. 2001; 135:759
42. Liaw YF, ChuCM, SuIJ, HuangMJ, Lin DY, Chang-chien CS. Clinical and histological event spreceding hepatitis B e antigen seroconversion in chronictype B hepatitis.*Gastroenterology*. 1983; 84:216-219.
43. Liaw YF, Pao CC, Chu CM, SheenIS, Huang MJ. Changes of serum hepatitis B virus DNA in two types of clinical events preceding spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis. *Hepatology*. 1987; 7:1-3.
44. Lok AS, Lai CL. Alpha-fetoprotein monitoring in Chinese patientswith chronic hepatitis B virüs infection: Role in the early detection of hepatocellularcarcinoma. *Hepatology*1989; 9:110-115.
45. Liaw YF, Tsai SL. Patogenesis and clinical significance of spontaneous exacerbations and remissions in chronic HBV infection. *Viral hepatitis Rev*. 1997; 143-54.

46. Yuen MF, Yuan HJ, Hui CK, et al. Large population study of spontaneous HBeAg seroconversion and acute exacerbation of chronic hepatitis B infection: implications for antiviral therapy. *Gut*. 2003; 52:416-419.
47. Pan CQ, Zhang JX. Natural history and clinical consequences of hepatitis B virus infection. *International journal of Medical Sciences* 2005; 2:36-40
48. Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34:617–624
49. Zeinab Nabil Ahmed Said. An overview of occult hepatitis B virus infection *World J Gastroenterol*, 2011 April 21;17(15):1927-38
50. Chan HL, Wong VW, Wong GL, Tse CH, Chan HY, Sung JJ. A longitudinal study on the natural history of serum hepatitis B surface antigen changes in chronic hepatitis B. *HEPATOLOGY* 2010;52:1232-1241.
51. Ulukaya E, Yilmaztepe A, Akgoz S, Linder S, Karadağ M. The levels of caspase – cleaved cytokeratin 18 are elevated in serum from patients with lung cancer and helpful to predict the survival. *Lung Cancer*, 2007;56:399-404.
52. Smith FJD. The molecular genetics of keratin disorders. *Am J Clin Dermatol*, 2003;4:347-364.
53. Quinlan RA, Schiller DL, Hatzfeld M, et al. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann NY Acad Sci*, 1985;455:282-306
54. Fischer R, Baumert T, Blum HE. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2007;13:4865-72.
55. Lapierre P, Beland K, Alvarez F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Transl Res* 2007;149:107-13.
56. Day CP. Apoptosis in alcoholic hepatitis: a novel therapeutic target. *J Hepatol* 2001; 34:330-3

57. Assuncao Guimaraes C, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem*, 2004; 271(9): 1638–50.
58. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*, 1984; 142(1):67-77.
59. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* 2001; 2:91-95
60. Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers, 1999; 342-346
61. Lok AS, McMohan BJ. Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 2009;50:601-2
62. Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol*. 2010;52: 514–522.
63. Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, et al. Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis.
64. Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol* 2005;42:302–8.
65. Lu HY, Zhuang LW, Yu YY, Si CW, Li J, Zhang JJ, et al. Effects of antiviral agents and HBV genotypes on intrahepatic covalently closed circular DNA in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 2008;14:1268–73.
66. Martinot-Peignoux M, Carvalho-Filho R, Lapalus M, et al. Hepatitis B surface antigen serum level is associated with fibrosis severity in treatment-naive, e antigen-positive patients. *J Hepatol*. 2013;58:1089–1095.
67. Gonzalez-Quintela A, Mallo N, Mella C, et al. Serum levels of cytokeratin-18 (tissue polypeptide-specific antigen) in liver diseases. *Liver Int* 2006;26:1217–24.
68. Yilmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, et al. Soluble forms of extracellular cytokeratin

18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2007;13:837–44.

69. Yilmaz Y. Systematic review: caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18—the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:1103–9.

70. Papatheodoridis, G. V. et al. Serum apoptotic caspase activity as a marker of severity in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Gut* 57, 500–506 (2008).

71. Feldstein, A. E. et al. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50, 1072–1078 (2009).

72. Rutherford, A. et al. Development of an accurate index for predicting outcomes of patients with acute liver failure. *Gastroenterology* 143, 1237–1243 (2012).

73. Bechmann, L. P. et al. Cytokeratin 18-based modification of the MELD score improves prediction of spontaneous survival after acute liver injury. *Journal of hepatology* 53, 639–647 (2010).

74. Jazwinski a B, Thompson a J, Clark PJ, et al. Elevated serum CK18 levels in chronic hepatitis C patients are associated with advanced fibrosis but not steatosis. *J Viral Hepat* 2012; 19: 278–82

75. Harald Farnika, Christian Markus Langea,b, Wolf Peter Hofmanna, Annemarie Bergerc, Regina Allwinnc, Martin-Walter Welkera, Jörg Trojana, Christoph Sarrazina, Eva Herrmannnd, Stefan Zeuzema, Bernd Kronenbergera,* Nucleos(t)ide analogue treatment reduces apoptotic activity in patients with chronic hepatitis B. *Journal of Clinical Virology* 52 (2011) 204– 209.

76. Anna Parfieniuk-Kowerda, Tadeusz W. Lapinski, Magdalena Rogalska-Plonska, Magdalena Swiderska, Anatol Panasiuk, Jerzy Jaroszewicz and Robert Flisiak Serum cytochrome c and m30-neoepitope of cytokeratin-18 in chronic hepatitis C. *Liver International* ISSN 1478-3223.
77. Yagmur E, Trautwein C, Leers MP, Gressner AM, Tacke F. Elevated apoptosis-associated cytokeratin 18 fragments (CK18Asp386) in serum of patients with chronic liver diseases indicate hepatic and biliary inflammation. *Clin Biochem* 2007; 10: 651-5
78. Zhujun Cao¹, Fengdi Li¹, Xiaogang Xiang¹, Kehui Liu¹, Yuhan Liu¹, Weiliang Tang¹, Lanyi Lin¹, Qing Guo¹, Shisan Bao², Qing Xie¹ & Hui Wang¹ Circulating cell death biomarker: good candidates of prognostic indicator for patients with hepatitis B virus related acute-on chronic liver failure
79. Chang Bum Baea, Soon Sun Kima, Seun Joo Ahna, Hyo Jung Choa, Sei Rhan Kima, Sun Young Parka, Ga Won Songa, Dong Joon Kimb, Seong Gyu Hwangc, Jin Mo Yangd, Young Bae Kime, Young Nyun Parkf, Sung Jae Shina, Sung Won Choa, Jae Youn Cheonga et al. Caspase-cleaved fragments of cytokeratin-18 as a marker of inflammatory activity in chronic hepatitis B virus infection *Journal of Clinical Virology* 58 (2013) 641– 646.
80. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012;57:167-185.
81. Cornberg M, Honer Zu Siederdisen C. HBsAg seroclearance with NUCs: rare but important. *Gut* 2014;63:1208-1209.
82. Colombo M. Does chemotherapy prevent HBV-related hepatocellular carcinoma? *Cons Dig Liver Dis* 2010;42(Suppl. 3):S298–301.

83. Liaw YF. Impact of hepatitis B therapy on the long-term outcome of liver disease. *Liver Int* 2011;31(Suppl. 1):117–21.
84. Takkenberg RB, Zaaijer HL, Molenkamp R, Menting S, Terpstra V, Weegink CJ, et al. Validation of a sensitive and specific real-time PCR for detection and quantitation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in plasma of chronic hepatitis B patients. *J Med Virol* 2009;81:988–95.
85. Suh SJ, Bae SI, Kim JH, Kang K, Yeon JE, Byun KS. Clinical implications of the titer of serum hepatitis B surface antigen during the natural history of hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 2014;86:117-23.
86. Park H, Lee JM, Seo JH, Kim HS, Ahn SH, Kim do Y, et al. Predictive value of HbsAg quantification for determining the clinical course of genotype C HBeAg-negative carriers. *Liver Int* 2012;32:796-802.
87. Yilmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, et al. Elevated serum levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 (CK18-Asp396) in patients with nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Med Sci Monit* 2009;15:CR189–93.
88. Jochum, C. et al. Hepatitis B-associated acute liver failure: immediate treatment with entecavir inhibits hepatitis B virus replication and potentially its sequelae. *Digestion* 80, 235–240 (2009).
89. Farnik, H. et al. Nucleos(t)ide analogue treatment reduces apoptotic activity in patients with chronic hepatitis B. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 52, 204-209 (2011).
90. Giannousis, I. P., Manolakopoulos, S. G., Hadziyannis, E., Georgiou, A. & Papatheodoridis, G. V. Changes of serum levels of keratin-18 fragments in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients under oral antiviral therapy. *Antiviral therapy* 16, 505–514 (2011).

