

ÖZGÜN ÇALIŞMA
KRONİK HEPATİT B HASTALARININ SERUM VE
KARACİĞER BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDE HEPATİT B
VİRUS DNA DÜZEYİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ORIGINAL ARTICLE

COMPARISON OF QUANTITATIVE HEPATITIS B VIRUS DNA LEVELS IN
SERUM AND LIVER BIOPSY SAMPLES OF CHRONIC
HEPATITIS B PATIENTS

Mehtap RÜZGAR¹, Sıla ÇETİN AKHAN¹, Haluk VAHABOĞLU¹

ÖZET: Kronik hepatit B (KHB) enfeksiyonu bütün dünyada önemli bir sağlık problemidir. KHB hastalarında tedaviye rağmen relapsların ortaya çıkması hasta yönetiminde sorun oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı, KHB hastalarında tedaviye başlarken yapılan karaciğer biyopsisi ve eş zamanlı olarak alınan kan örneklerinde kantitatif olarak hepatit B virusu (HBV) DNA miktarının saptanması ve karşılaştırılmasıdır. Çalışmaya, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Enfeksiyon Polikliniği'ne başvuran KHB ön tanısı almış 69 hasta (49 erkek 20 kadın; yaş aralığı: 19-68 yıl, yaş ortalaması: 36.91±11.03 yıl) dahil edilmiştir. Tüm hastaların serum HBV-DNA düzeyleri, hastanemiz rutin laboratuvarında ticari bir gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) (RQ-PCR; iCycler IQ System, BioRad Laboratories) ile çalışılmış ve ortalama serum HBV-DNA (Serum DNA 2) miktarı $5.6E+6 \pm 8.5E+6$ kopya/ml olarak belirlenmiştir. Hastaların ortalama ALT düzeyleri ise 79.59 ± 69.7 'dir. Çalışmamızda hastaların serum ve karaciğer dokusundaki HBV-DNA düzeyleri ayrıca "in-house" RT-PCR (Techne Quantica, Londra) ile araştırılmıştır. Örneklerden nükleik asit ekstraksiyonu, DNA Mini Kit (QIAamp, QIAGEN Inc, Hilden, Almanya) ile yapılmış ve HBV X genini hedefleyen primerler (F-5'-TTCGCTT CACCTCTGCACG-3' ve R- 5'-CCCAACTCCCAGTCTTTAA-3'; probe: 5'-FAM-AATGTCAAC GACCGACCTTGAGGCA-p-BHQ-3') kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede Spearman korelasyon analizi uygulanmıştır. "In-house" RT-PCR yöntemiyle KHB'li hastaların serumlarındaki HBV-DNA (Serum DNA 1) düzeylerinin ortalama değeri $4E+6 \pm 4.4+6$ kopya/ml; karaciğer biyopsi dokularındaki HBV-DNA düzeylerinin ortalama değeri ise $8.99E+6 \pm 3.1E+7$ kopya/ml olarak saptanmıştır. Hasta serumlarında hem ticari hem de "in-house" RT-PCR yöntemleriyle alınan HBV-DNA sonuçları arasında (sırasıyla, Serum DNA 2 ve Serum DNA 1) anlamlı pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür ($r=0.300$; $p=0.024$). Karaciğer dokusunda saptanan HBV-DNA düzeylerinin serum düzeylerinden daha yüksek olduğu izlenmiş, ancak serum HBV-DNA 1 ve 2 değerleri ile karaciğer HBV-DNA düzeyleri arasında korelasyon saptanamamıştır (Serum DNA 1: $r=0.104$, $p=0.404$; Serum DNA 2: $r=-0.135$, $p=0.321$). Bu durumun "in-house" RT-PCR yöntemindeki standardizasyon sorunundan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Sonuç

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli. (silacetin@superonline.com)

olarak, tedaviye başlarken hastalara karaciğer biyopsisi yapılmasının, kronik karaciğer hastalığının derecesini belirlemek yanında, bu örneklerde HBV DNA'sının kantitatif olarak saptanmasının da yararlı olabileceği, ancak bu amaçla standardize edilmiş duyarlı yöntemlerin kullanılmasının gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Kronik hepatit B, HBV DNA, karaciğer biyopsisi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

ABSTRACT: Chronic hepatitis B (CHB) is an important health problem worldwide. Relapses in CHB patients, even treated, create a major problem in patient management. The aims of this study were the detection of quantitative levels of hepatitis B virus (HBV) DNA in the sera and liver biopsy specimens of CHB patients and the comparison of the results. A total of 69 patients (49 male, 20 female; age range: 19-68 years, mean age: 36.91 ± 11.03 years) who were prediagnosed as CHB in the Infectious Diseases and Clinical Microbiology Department of Kocaeli University (northwestern region of Turkey) were included to this prospective study. HBV-DNA levels of all of the patients were initially measured in the routine laboratory of our hospital by using a commercial real-time polymerase chain reaction (RQ-PCR; iCycler IQ System, BioRad Laboratories) and the mean HBV-DNA level (Serum DNA #2) was detected as $5.6E+6 \pm 8.5E+6$ copies/mL. The mean level of ALT in CHB patients was 79.59 ± 69.7 . In our study the HBV-DNA levels of the serum and liver biopsy specimens were also measured by using an "in-house" real-time PCR (RT-PCR) (Techne Quantica, London, UK). Nucleic acid extractions were performed with the use of QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. The primers were specific for the X gene region of HBV (forward primer: 5'-TTCGCTTCACCTCTGCACG-3', reverse primer: 5'-CCCAACTCCCAGTCTTTAA-3'; probe: 5'-AATGTCAACGACCGACCTT GAGGCA-pBHQ-3'). Statistical analysis was carried out with Spearman rank analysis. With the use of "in-house" real-time PCR, mean levels of HBV-DNA were found to be $8.99E+6 \pm 3.1E+7$ copies/mL in the liver biopsy samples, and $4E+6 \pm 4.4E+6$ copies/mL in serum samples (Serum DNA 1). There were significant positive correlations between the results obtained from in-house (Serum DNA 1) and commercial RT-PCR (Serum DNA 2) ($r=0.300$; $p=0.024$) methods. Although HBV-DNA levels in the liver tissues were found higher than those in serum samples, no correlation between the HBV-DNA levels of liver biopsy and serum samples (both serum DNA 1 and 2) was detected. This result was attributed to the standardization problems of in-house RT-PCR. In conclusion, liver biopsies performed at the beginning of the therapy to detect the grade of chronic liver disease, would also be searched by means of quantitative HBV-DNA levels, however, since the determination of HBV-DNA load in liver tissues may be difficult, standardized sensitive methods should be used for this purpose.

Key words: Chronic hepatitis B, HBV DNA, liver biopsy, real time polymerase chain reaction.

GİRİŞ

Kronik hepatit B (KHB) enfeksiyonunda antiviral tedavinin amacı, viral replikasyonun baskılanması ve karaciğer hasarının önlenmesidir. KHB tedavisi ile kanda HBV DNA'nın saptanamayacak düzeye inmesi mümkün olabilmektedir¹. Ancak cccDNA'nın karaciğerde sebat etmesi nedeniyle tedaviden sonra kandan eradike edilebilmesine karşın, karaciğerden eradike etmek çoğunlukla mümkün olamamaktadır. Bu çalışmada, KHB'li hastalarda tedaviye başlarken

yapılan karaciğer biyopsisi ile eş zamanlı olarak alınan kan örneklerinde HBV-DNA düzeylerinin kantitatif olarak saptanması ve sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mart 2005 - Mayıs 2006 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Enfeksiyon Polikliniği'ne başvuran KHB ön tanısı almış olan yaşları 19-68 yıl arasında değişen (ortalama: 36.91 ± 1.03) 49 erkek ve 20 kadın hasta çalışmaya alındı. Hastaların başlangıç rutin biyokimyasal testleri çalışıldı. Altı aylık takipleri yapılarak uygun olanlar çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan hastaların karaciğer biyopsileri ve serum örnekleri aynı zamanda alındı. 13 hastanın serum örnekleri biyopsi örnekleri ile eş zamanlı alınmadığı için çalışma 56 hastanın serumu ile yapıldı. Hastalarda, hepatit C veya D virusları ile koenfeksiyon, alkolik karaciğer hastalığı, otoimmün hepatit ve ilaca bağlı hepatit gibi başka bir karaciğer hastalığı mevcut değildi. Hastaların hiçbiri daha önceden antiviral veya interferon tedavisi almamıştı.

Kronik hepatit B tanısını koymak için HBsAg'nin altı aydan uzun süre pozitif olması, serum HBV-DNA düzeyinin HBeAg pozitif hastalar için 10^5 kopya/ml, HBeAg negatif hastalar için ise 10^4 kopya/ml olarak tespit edilmesi (hastanemiz rutin laboratuvarında çalışılan serum HBV-DNA sayıları), ALT ve AST düzeylerinde sürekli veya aralıklı iki katından fazla yükselme saptanması ve karaciğer biyopsisinde kronik karaciğer hastalığının saptanması şartı arandı. Örnekler toplandıktan sonra çalışılincaya kadar -80°C 'de saklandı. Karaciğer biyopsileri yapılmadan önce hastalara karaciğer ultrasonografisi (USG) yaptırılarak hemanjiyom veya yer kaplayıcı lezyon tespit edilmeyen hastalara perkütan yöntem ile, hemanjiyom veya yer kaplayıcı lezyon tespit edilenlere ise USG aracılı ince iğne aspirasyon biyopsisi yapıldı. Biyopsi örnekleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı rutin laboratuvarında Modifiye Scheuer skorlama yöntemi kullanılarak incelendi. Bu yöntemde "grade" hepatik nekroinflamatuvar aktiviteyi, "stage" ise karaciğer fibrozisini göstermekte, skorlar 0-4 arasında değerlendirilmekte ve >1 değerler kronik hepatiti işaret etmektedir.

Serum ve karaciğer dokusundaki HBV-DNA, DNA Mini Kit (QIAamp, QIAGEN Inc, Hilden, Almanya) ile ekstrakte edildi. HBV-DNA düzeyi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (Techne Quantica, Londra) ile X bölgesinin primerleri (F-5'-TTCGCTTCACCTCTGCACG-3' ve R-5'-CCCAACTCCCAGTCTTTAA-3'; probe: 5'-FAM-AATGTCAACGACCGACCTTGAG GCA-p-BHQ-3') kullanılarak ölçüldü. Hastaların hastanemiz rutin laboratuvarında HBV-DNA düzeyleri gerçek zamanlı PCR (RQ-PCR), iCycler IQ System (BioRad Laboratories) ile çalışıldı.

HBV-DNA pozitif kontrolü, HBV "X" bölgesinin 386 bazçiftlik kısmının klasik PCR ile çoğaltılarak PCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, USA) vektörüne eklenmesi ile elde edildi. Bu amaçla F-5'-ACGTCCTTTGTTTACGTCCCGT-3' ve R 5'-GACCAATTTATGCCTACAGCC-3' primerleri kullanılarak elde edilen ürün, PCR artıklarından PCR Purification Kit (Roche) kullanılarak temizlendi. Klonlama

işlemi oda derecesinde 10 dakika tutularak yapıldı. Plazmid transformasyonu elektro-kompetan DH10B hücrelerine elektroporator (Ependorf) aracılığı ile 1700 V ile yapıldı ve ampisilin içeren besiyerlerinde klonlanmış plazmidi taşıyan alıcılar üretildi. Alkalın lizis metodu ile plazmid izolasyonu yapıldı ve klasik PCR ile "insert" varlığı doğrulandı. Plazmid kopya sayısı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı.

$$\text{Kopya sayısı} = \frac{6.02 \times 10^{23} \text{ (copy / mol)} \times \text{DNA amount (g)}}{\text{DNA length (dp)} \times 660 \text{ (g / mol / dp)}}$$

Plazmid kopya sayısı 10⁷/μl olacak şekilde ayarlandı. 10 kat seyreltmeler ile hazırlanan pozitif kontrol serisi TaqMan PCR işleminde sayı belirlemek için kullanıldı.

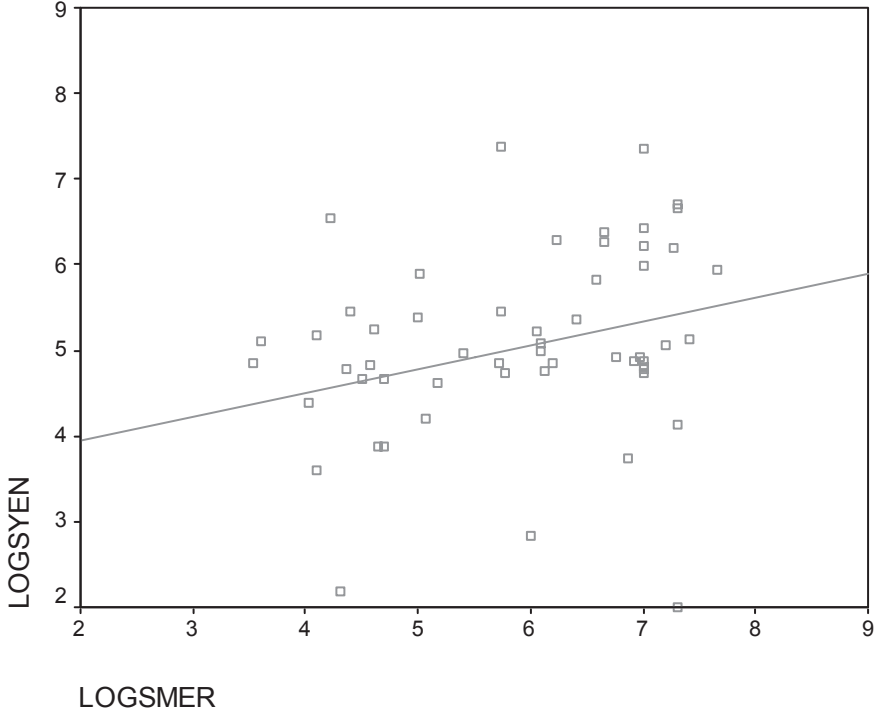
PCR işlemi için ana karışım her reaksiyonda (25 μl) 10 pmol her bir primer ve 5 pmol FAM ve Quencher işaretli prob, 1.5 mM MgCl₂ ve %0.1 ROX boyası içerecek şekilde hazırlandı. "Hotstart Taq polymerase" (Fermentas) kullanıldı. RT-PCR Techne Quantica cihazında 10 dakika 95°C başlangıç denatürasyon-aktivasyon safhasından sonra 40 siklus 95°C de 30 san, 55°C de 15 san ve 60°C 1 dak yapıldı.

Kopya sayısı, cihazın çalışmasını koordine eden program tarafından kopya sayısı bilinen pozitif kontrollere göre hesaplandı. İstatistiksel değerlendirmede SPSS 10.0 Windows İstatistik Programı kullanıldı ve veriler "ortalama±standart sapma" olarak hesaplandı. Serum ve karaciğer HBV-DNA düzeyleri arasındaki ilişki ve bizim çalıştığımız yöntem ile hastanemiz rutin laboratuvarında çalışılan serum DNA'ları arasındaki ilişki ise Spearman korelasyon testi ile değerlendirildi. p değeri 0.05'ten düşük ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, 62 hastanın karaciğer biyopsi dokusunda ve 56 hastanın serumunda "in-house" RT-PCR ile saptanan HBV-DNA düzeyleri (Serum DNA 1), 69 hastanın hastanemiz rutin laboratuvarında ticari RT-PCR ile çalışılan serum HBV-DNA düzeyleri (Serum DNA 2) ile karşılaştırılmıştır. Ortalama HBV-DNA düzeyleri, karaciğer biyopsi dokularında 8.99E+6±3.1E+7 ve serumlarda (Serum DNA 1) 4E+6±4.4E+6 olarak saptanmıştır. Ticari PCR ile hastaların ortalama serum HBV-DNA düzeyi (Serum DNA 2) ise 5.6E+6±8.5E+6 olarak bulunmuştur.

Hasta serumlarından her iki yöntemle elde edilen kantitatif HBV-DNA sonuçları (Serum DNA 1 ve 2) değerlendirildiğinde; aralarında anlamlı pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür (r=0.300, p=0.024; Şekil 1). Çalışmada, karaciğer dokusunda saptanan HBV-DNA düzeylerinin serum düzeylerinden daha yüksek bulunmuş, ancak serum HBV-DNA 1 ve 2 değerleri ile karaciğer HBV-DNA düzeyleri arasında korelasyon saptanamamıştır (HBV-DNA 1: r=0.104, p=0.404; HBV-DNA 2: r=-0.135, p=0.321). Hastaların ALT düzeylerinin ortalama değeri 79.59±69.7 olarak bulunmuştur (Tablo I).



Şekil 1. Serum DNA 1 ve serum DNA 2 düzeyleri arasındaki pozitif korelasyon.

Tablo I. Hastaların Karaciğer Dokusunda ve Serum Örneklerinde Saptanan HBV-DNA Düzeyleri ve ALT Sonuçları

Hasta No.	Karaciğer HBV-DNA (kopya/ml)	Serum DNA 1* (kopya/ml)	Serum DNA 2* (kopya/ml)	Başlangıç ALT düzeyi (IU/L)
1	552386,9841	176125,9664	41100	26
2	1751,607331	153517,3687	12400	72
3	6919,83064	59004,21745	22700	33
4	2573363,835	91582,78423	258000	247
5	941341,0909	7391,542588	48900	14
6	116634,1626	5554,309443	7350000	198
7	38434,88067	651392,0924	3820000	50
8	25312,86418	978258,1182	10000000	47
9	251741,4063	46077,03095	49200	43
10	329,5336444	13528,97569	20000000	55
11	179053,6974	69579,62764	3440	35
12	438535,5176	1891688,58	1680000	28
13	4482,820122	113473,0169	16100000	87
14	15953,79333	4976194,819	20000000	79
15	236974530	7639,323346	43800	50
16	38014761,25	234384,2371	2520000	315
17	42664,98517	131622,987	26300000	101
18	195510,214	53447,03625	600000	100

Tablonun Devamı Diğer Sayfada

Tablo I. Hastaların Karaciğer Dokusunda ve Serum Örneklerinde Saptanan HBV-DNA Düzeyleri ve ALT Sonuçları (Devamı)

Hasta no.	Karaciğer HBV-DNA (kopya/ml)	Serum DNA 1* (kopya/ml)	Serum DNA 2* (kopya/ml)	Başlangıç ALT düzeyi (IU/L)
19	100551,0557	46330,94108	32400	91
20	5031189,141	4532361,923	20000000	82
21	1330776,159	58680,85325	1350000	25
22	12805559,78	23959344,96	547000	35
23	359820,5134	279447,8136	24600	11
24	73107479,95	71912,08973	516000	56
25	1987,601682	95174,43041	1230000	318
26	29523447,16	60315,59193	10000000	184
27	51713,48649	54935,97059	10000000	86
28	16762688,53	1621899,225	10000000	30
29	240913,743	67322,81874	38000	46
30	8716339,325	165794,6093	1140000	83
31	58359,26119	857381,729	45000000	41
32	574050,2107	1871011,136	4460000	61
33	10919082,76	155,213963	20500	134
34	17229665,64	76814,20276	8460000	117
35	14372,02287	285658,5684	550000	47
35	13454832,07	71126,04163	1590000	68
37	1445122,073	2462680,744	4570000	50
38	247625,1487	41054,91479	147000	68
39	254,5235217	102,2225097	20000000	130
40	8433625,651	3481497,677	17000	30
41	3295336,444	763932,3346	104000	19
42	32414539,55	123223,0982	1230000	17
43	11409831,64	84336,25651	9550000	161
44	29040705,31	2630557,097	10000000	81
45	265962,8649	15779,40751	116000	171
46	4948923,492	65139,20924	10000000	91
47	10979,25299	84800,9963	5810000	237
48	14137,024	242241,312	101000	45
49	1657946,093	23959,34496	10600	17
50	665869,345	3885,964302	12700	51
51	264505,2933	669,5386562	1000000	33
52	1998554,475	23055178,89	10000000	45
53	1469144,248	125961,7436	4100	179
54	335011,4618	30,34591512	91100	45
55	46077,03095	73107,47995	10000000	191
56	32772,76822	1595379,333	19000000	154
57	186075,7326	ND*	43900	35
58	7391,542588	ND	21200	15
59	346241,7825	ND	23300000	50
60	11663,41626	ND	18400000	39
61	8573,81729	ND	225000	14
62	5257311,658	ND	114000	46
63	ND*	ND	186000	19
64	ND	ND	10000000	32
65	ND	ND	98800	93
66	ND	ND	20200	65
67	ND	ND	24000	56
68	ND	ND	384000	50
69	ND	ND	63400	21

* Serum DNA 1: Çalışmada "in-house" RT-PCR ile alınan değerler; Serum DNA 2: Rutinde ticari RT-PCR ile alınan değerler; ND: Çalışılmadı.

TARTIŞMA

Kronik hepatit B (KHB) hastalarının tedavisine karar verilirken, serum HBV-DNA yükü temel öğelerden birini oluşturmaktadır. Serumda kantitatif HBV-DNA ölçümü ile, kronik hepatit B tedavisi başlama endikasyonu, tedaviye yanıtın takibi ve tedavi sonlandıktan sonra tekrarları belirlemek mümkün olabilmektedir¹. HBV, karaciğere tropizm gösteren bir virus olması dolayısıyla karaciğerdeki HBV-DNA düzeyi de önemlidir. Ancak her ne kadar HBV primer olarak karaciğere tropizm gösterse de yapılan çalışmalar, akut ve kronik olarak enfekte hastalarda HBV nükleik asitleri ve proteinlerinin periferik kan mononükleer hücreleri, lenf nodu, dalak, kemik iliği, böbrek, deri, kolon, mide, testis ve böbreküstü bezlerde de saptandığını göstermiştir²⁻⁴. Matsuyama ve arkadaşlarının⁵ çalışmasında, serumda HBV-DNA saptanamayacak düzeyde iken, HBeAg pozitif örneklerin %17.5'inde ve HBeAg negatif, anti-HBe pozitif örneklerin %23.8'inde karaciğerde HBV-DNA pozitifliği saptanmıştır. Lee ve arkadaşları⁶ da, sirozlu hastaların %46'sında serumda HBV-DNA negatif iken karaciğerde HBV-DNA saptadıklarını bildirmişler ve serum ve karaciğer HBV-DNA düzeyleri arasında güçlü bir korelasyon belirlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise, kronik olarak enfekte hastaların karaciğerlerinde HBV cccDNA'sının ve pregenomik RNA'nın viral replikasyon için iyi birer gösterge olduğu ifade edilmektedir⁷. Lu ve arkadaşları⁸, 41 HBeAg pozitif KHB hastası ile yaptıkları bir çalışmada, hastaların intrahepatik HBV-DNA düzeyi ile serum HBV-DNA düzeylerini karşılaştırmışlar ve intrahepatik HBV-DNA düzeyini, serum HBV-DNA düzeyinden daha yüksek saptamışlardır. Bu araştırmacılar, HBV replikasyonunu göstermede intrahepatik kantitatif HBV-DNA tespitinin, serum HBV-DNA tespitine göre daha duyarlı olduğunu ileri sürmüşlerdir⁸. Bizim çalışmamızda da, KHB hastalarının serum ve karaciğer biyopsi örneklerinde kantitatif olarak çalışılan HBV-DNA düzeyleri karşılaştırıldığında, karaciğer dokusunda saptanan HBV-DNA yükü serumdakinden daha yüksek bulunmuş, ancak istatistiksel olarak bir korelasyon tespit edilememiştir.

Antiviral tedavi protokolüne alınan hastalarda, tam bir virus eradikasyonu için enfekte hepatositlerin normal yaşam sürelerini tamamlayıncaya kadar etkin bir replikasyon blokajı yapılması ve tedavinin karaciğer dokusundan HBV temizleninceye kadar devam etmesi gerekmektedir⁹⁻¹³. Krogsgaard ve arkadaşlarının¹⁴ çalışmasında, KHB nedeniyle interferon tedavisi alan hasta grubunda 4-8 yıllık takipler sonucu, HBeAg eradikasyonunun %80-90 oranında sağlanmasına rağmen, serumda HBV-DNA pozitifliğinin PCR ile saptanabilir düzeyde kaldığı belirlenmiştir.

HBSAg pozitif hastaların takibindeki önemli parametrelerden biri de ALT düzeyleridir. ALT düzeyinde sürekli veya aralıklı yükselmeler olabilmektedir. Bizim çalışmamızda, hastaların başlangıç ALT düzeyleri 11-318 IU/L arasında değişmekte olup, ortalamaları 79.59 ± 69.7 ve ortanca değeri 50.5 olarak hesaplanmıştır. HBeAg negatif KHB hastalarında ALT'nin normale dönmesi ve serumda HBV-DNA negatifliği, tedaviyi sonlandırmaya karar vermek için gereklidir. Yapılan bir çalışmada, interferon tedavisi alan hastalarda 12 aylık

yanıt oranı ortalama %24 olarak tespit edilirken, kontrol grubunda hiç yanıt olmadığı belirlenmiş; ancak yanıt alınanların yaklaşık yarısında relaps olmasının önemli bir problem oluşturduğu vurgulanmıştır¹⁵. Bu sonuçlar, HBV'nin yapısı dolayısıyla karaciğerde sebat etmesinin temel sorunlardan birisi olduğunu ve bu nedenle de karaciğerde DNA düzeyinin tespitinin önemini vurgulamaktadır¹⁵.

HBV'nin eradikasyonu, aktif viral replikasyonun inhibisyonu ile gerçekleşir. Bunun için de cccDNA'nın tamamen yok edilmesi gerekmektedir¹⁶. Yapılan bir çalışmada serum cccDNA düzeyi intrahepatik cccDNA düzeyi ile ilişkili bulunmuştur¹⁷. Yuen ve arkadaşları¹⁷, HBsAg'nin temizlenmesinden sonra hastalarının %37.5'inin karaciğer dokusunda HBV-DNA yükünü saptanabilir düzeyde bulmuşlar ve intrahepatik HBV DNA'sının esas olarak cccDNA formunda bulunduğunu göstermişlerdir. Serum ve intrahepatik HBV-DNA düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren benzer çalışmalarda da, intrahepatik HBV-DNA düzeyinin 1.2 kopya/hücre, cccDNA düzeyinin ise <0.12 kopya/hücre olan hastaların serumlarında cccDNA saptanmadığı; serum cccDNA düzeyi ile intrahepatik cccDNA ve serum total HBV-DNA düzeyi arasında ilişki olduğu bildirilmektedir¹⁸⁻²⁰.

Hastanemiz rutin laboratuvarında HBV-DNA düzeyleri, ticari bir RT-PCR ile çalışılmakta ve güvenilirliği NEQAS (Londra, İngiltere) tarafından yapılan dış kontroller ile teyid edilmektedir. Çalışmaya aldığımız KHB hastalarının serumlarında, hem "in-house" hem de ticari RT-PCR ile alınan sonuçlar arasında pozitif bir korelasyon saptanmakla beraber, karaciğer biyopsi örneklerinde saptanan DNA miktarı ile korelasyon saptanmamıştır. Karaciğer dokusunda "in-house" RT-PCR ile kantitatif HBV-DNA tayini, oldukça güç standardize edilebilir bir yöntem olduğundan, bu amaçla kullanılacak standardizasyonu ve kalite kontrolünün daha kolay yapılabileceği yeni yöntemlere gereksinim olduğu düşünülmüştür. Hastalara tedaviye başlarken karaciğer biyopsisi yapılmasının, kronik karaciğer hastalığı derecesini saptamak yanında, karaciğer biyopsi örneklerinde HBV-DNA miktar tayininin de yapılması yararlı olabilir. Bu yöndeki çalışmalar arttıkça, hem tedavi endikasyon kriterlerinde önemli değişiklikler olabilir, hem de tedaviye alınan hastaların daha sonra yapılacak biyopsi örneklerindeki HBV-DNA miktarı ile karşılaştırılarak tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde serum HBV-DNA düzeylerine göre daha yönlendirici kararlar alınabilir kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Loomba R, Liang T.J. Treatment of chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2007; 12 (Suppl 3): H33-41.
2. Neurath AR, Strick N, Sproul P, Ralph H, Valinsky J. Detection of receptors for hepatitis B virus on cell of extrahepatic origin. *Virology* 1990;176: 448-57.
3. Mason A, Wick M, White H, Perrillo R. Hepatitis B virus replication in diverse cell types during chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1993; 18: 781-9.
4. Yoffe B, Burns DK, Bhatt HS, Combes B. Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequences in patients with acute hepatitis B infection. *Hepatology* 1990; 12:187-92.
5. Matsuyama Y, Omata M, Yokosuko O, Imazeki F, Ito Y, Okuda K. Discordance of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in serum. Analysis of 1063 specimens. *Gastroenterology* 1985; 89: 1104-8.

6. Lee CZ, Huang GT, Yang PM, Sheu J, Lai MY, Chen DS. Correlation of HBV DNA levels in serum and liver of chronic hepatitis B patients with cirrhosis. *Liver* 2002; 22: 130-5.
7. Laras A, Koskinas J, Dimou E, Kostamena A, Hadziyannis SJ. Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients. *Hepatology* 2006; 44: 694-702.
8. Lu H, Ma LX, Xu WS, Zhang HY, Yu LJ, Duan HY. Quantitative detection of intrahepatic hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 173-5.
9. Tacke F, Trautwein C. Serum hepatitis B virus DNA level as a risk predictor for liver disease complications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 426-7.
10. Kato Y, Nakao K, Hamasaki K, et al. Spontaneous loss of hepatitis B surface antigen in chronic carriers, based on a long-term follow-up study in Goto Islands, Japon. *J Gastroenterol* 2000; 35: 201-5.
11. Huo TI, Wu JC, Lee PC, et al. Seroclearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis. *Hepatology* 1998; 28: 231-6.
12. Song BC, Suh DJ, Lee HC, Chung YH, Lee YS. Hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine therapy is not durable in patients with chronic hepatitis B in Korea. *Hepatology* 2000; 32: 803-6.
13. Akarca US. Kronik B hepatitinde interferon dışı tedaviler ve interferon ile yapılan kombinasyonlar, s: 156-78. *Viral Hepatit*, 2003. Ohan Matbaası, İstanbul.
14. Krogsgaard K. The long-term effect of treatment with interferon-alpha 2a in chronic hepatitis B. The Long-term Follow-up Investigator Group. The European Study Group on Viral hepatitis (EUROHEP). Executive Team on Anti-Viral Treatment. *J Viral Hepat* 1998; 5: 389-97.
15. Manesis E, Hadziyannis SJ. The long-term outcome of interferon-alpha treated and untreated patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001; 34: 306-13.
16. Asmuth DM, Nguyen HH, Melcher GP, Cohen SH, Pollard RB. Treatments for hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1353-62.
17. Yuen MF, Wong DK, Sablon E, et al. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology* 2004; 39: 1694-701.
18. Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2000; 7: 258-67.
19. Pawlotsky JM. Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods and practical use) and viral kinetics. *J Hapatol* 2003; 39 (Suppl 1): S31-5.
20. Akhan SC, Yulugkural Z, Vahaboglu H. Response to interferon-alpha in chronic hepatitis B patients with and without precore mutant strain and effects on HBsAg titers. *Chemotherapy* 2007; 53: 402-6.