

**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP  
FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI  
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI**

**KRONİK B HEPATİTLİ OLGULARIN KARACİĞER DOKUSU  
İSTİRAHAT STAT PROTEİN PROFİLİ**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ  
DR.ALPER SANCAK**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF.DR.SEREN ÖZENİRLER**

**ANKARA – 2008**

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP  
FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI  
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI

KRONİK B HEPATİTLİ OLGULARIN KARACİĞER DOKUSU İSTİRAHAT  
STAT PROTEİN PROFİLİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ  
DR.ALPER SANCAK

TEZ DANIŞMANI  
PROF.DR.SEREN ÖZENİRLER

ANKARA – 2008

## TEŐEKKÜRLER

Asistanlık eğitimi süresi içinde bilgi, deneyim ve desteğini esirgemeyen ve her zaman yakın ilgisini gördüğüm değerli hocalarım Gastroenteroloji BD Kurucu Öğretim Üyesi Prof. Dr. Uęur Kandilci'ye, Gastroenteroloji BD Başkanı Prof. Dr. Selahattin Ünal'a, Tez Danışmanım Prof. Dr. Seren Özenirler'e, Hocalarım Prof. Dr. Candan Tunçer'e, Prof. Dr. Gıyasettin Şükriü Dumlu'ya, Doç. Dr. Mehmet Cindoruk'a, Doç. Dr. İbrahim Doęan'a, tezim konusunda patolojik değerlendimeyi yapan Gazi ÜTF. Patoloji BD Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Gülen Akyol'a, Yrd. Doç. Dr. Özgür Ekinci'ye, Arş. Gör. Dr. Gonca Barıt'a, olguların toplanmasında bana yardımcı olan tüm Gastroenteroloji ve İç Hastalıkları Araştırma Görevlilerine, her konuda bana destek olan Endoskopi Ünitesi Hemşireleri ve Çalışanlarına, beni bugünlere taşımak için her türlü fedakarlığı esirgemeyen aileme ve eşime içtenlikle teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>1. Giriş ve Amaç</b>	<b>1</b>
<b>2. Genel Bilgiler</b>	<b>3</b>
Hepatitis B Virusu	3
Kronik HBV Enfeksiyonunun Klinik Prezantasyonları	4
HBV Enfeksiyonunun Doğal Seyri	5
HBV Enfeksiyonunda Mutantlarının Klinik Önemi	7
HBV Enfeksiyonunun İmmünopatogenezi	8
Kronik B Hepatiti	14
HBV Hepatitinde Sitokinler	18
STATlar	19
STATlar ve Karaciğer Hastalıkları	27
<b>3. Hastalar Ve Yöntem</b>	<b>34</b>
<b>4. Bulgular</b>	<b>37</b>
Genel Bilgiler	37
STAT Karakteristikleri	37
STAT Proteinleri ile Yaş ve Cinsiyet İlişkileri	38
STAT-Determinant İlişkileri	40
<b>5. Tartışma Ve Sonuç</b>	<b>46</b>
<b>6. Özet</b>	<b>51</b>
<b>7. Kaynaklar</b>	<b>53</b>

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ellinin üzerinde faktörü içeren sitokinler; laktasyondan büyüme, şişmanlıktan hematopoeze kadar birçok fizyolojik veya patolojik işlevde rol almaktadırlar(1). Önemli bir görev sahaları ise inflamasyonun regülasyonudur. Bu işlevleri tip I/II sitokin reseptörlerini kullanarak yerine getirmektedirler. Bu reseptörlerin sitokin tarafından uyarılmasıyla hücre içinde serbest halde bulunan STAT proteinleri, intrinsek enzimatik aktivitesi olmayan bir sitoplazmik protein kinaz ailesine bağlanıp fosforile olarak hücre içi sinyal akımını başlatmaktadırlar(2). Sitokin uyarımı ile reseptör agregasyonu meydana gelmekte, bu da reseptörlerin sitoplazmik kısmında yerleşik olan tirozin kinazı aktive ederek otofosforilasyonunu sağlamaktadır. Bu tirozin kinaz ailesine Janus kinaz veya kısaca Jak adı verilmektedir. Aktif hale geçen Jak'lar, sitokin reseptörlerinin kuyruk kısmında yer alan tirozin rezidülerini fosforile etmektedirler. Fosforile olan sitokin reseptörü ise "signal transducers and activators of transcription" (STAT) olarak adlandırılan bir dizi protein için bağlanma bölgesi oluştururlar(3). STAT'lar, intrasitoplazmik yerleşimli ve DNA'ya bağlanabilen molekülerdir. STAT'lar bu bölgeye bağlanıp fosforile olurlar. İntrasitoplazmik reseptörden ayrıldıktan sonra STAT'lar dimerize olarak, nükleusa geçerler. Burada DNA'nın belli elementlerine bağlanarak ilgili gen veya genlerin regülasyonunu sağlarlar. Böylelikle sitokin tarafından verilen komut DNA'da gen transkripsiyonuyla sonuçlanmaktadır.

STAT'ların, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6 olmak üzere 7 tipi belirlenmiştir. Her bir sitokin, 2 ayrı sitokin reseptörü üzerinden 4 ayrı JAK'ı ve 7 tip STAT'dan bir ya da birkaçını kullanarak işlevlerini gerçekleştirirler. Bu sinyal sisteminde yer alan moleküllerin işlevleri, özellikle yok edilmiş fare modellerinde açıklığa kavuşturulmaya çalışılmıştır(4). Örneğin, STAT1 eksikliğinde virus duyarlılığında artış,

antiviral yanıtta azalma, tümör gelişimine yatkınlık, STAT2 eksikliğinde antiviral yanıtta azalma ve STAT3 eksikliğinde de embryo ölümü meydana gelmektedir.

Kronik B hepatiti tüm dünyada ciddi morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir(5). Tedavi başarı oranları en iyi koşullarda dahi %20'nin altındadır. Uygulanan tedaviye klinik cevabın düşük olmasının en önemli nedenlerinden biri etiopatogenetik ve patofizyolojik determinantların yeterince bilinmemesi ve buna bağlı olarak da uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilememesidir. Hepatitis B virus (HBV)'unun uyardığı veya inhibe ettiği immün sistemde yer alan hücreler ve moleküller, konağın genetik yapısı ile birlikte hastalığın seyrini ve tedaviye olan yanıtı belirlemektedir. Antiviral yanıtın gelişmesinde, viral immün kaçışlarda sitokinlerin de etkili oldukları bilinmektedir(6). Son yıllarda sitokin sinyal sisteminin yavaş yavaş aydınlığa kavuşmasıyla birlikte, bu sinyal sisteminin HBV enfeksiyonlarındaki rolüne dair çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Viruslara karşı doğal immün yanıtta yer alan başlıca sitokin interferondur(7). HBV enfeksiyonunun standart tedavisinde yer alan bir sitokin olan interferonun reseptöre bağlandıktan sonra hücre içinde gelişen olaylar hakkında elde edilecek her bilgi, bu sitokinin HBV enfeksiyonunun tedavisindeki etkinliğini veya etkisizliğini anlamamıza yardımcı olacaktır. Örneğin HBV enfeksiyonunun interferon tedavisine olan cevapsızlığını açıklayabilmek amacıyla yapılan çalışmalarda STAT1, STAT2, STAT3, SOCS1 ve SOCS3 moleküllerinin göz ardı edilemez önemini destekler nitelikte bilgiler elde edilmiştir. Bu konuda yapılmış olan çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır ve genellikle deneylerde in vitro düzenekler kullanılmıştır.

Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda karaciğer biyopsisi ile tanısı desteklenmiş kronik B hepatitli olguların karaciğer dokularındaki STAT proteinlerinin durum analizi yapılmıştır. Bu STAT proteinlerinin HBV enfeksiyonunun immünopatogenezine katkısı üzerinde

durulmuş, ALT değerleri, viral yük, hepatik zedelenme, fibrozis üzerine etkileri ve kliniğe olası katkıları araştırılmıştır.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1 HEPATİTİS B VİRUSU**

HBV dünya genelinde 400 milyondan fazla insanı etkilemiş durumdadır. Hepatit B aşısına rağmen HBV prevalansında çok az oranda azalma meydana gelmiştir. HBV’u direkt hepatotoksik etki gösteren bir virus değildir(8). Virus, konağın bağışıklık sistemiyle ilişkiye girer ve hücre genomuna entegre olur. HBV ile enfekte karaciğer hücrelerine karşı immün yanıt geliştiğinde ise doku zedelenmesi meydana gelir. Konağın immün yanıtı ile virus replikasyonu arasındaki bu yakın ilişki, karaciğer dokusunda meydana gelen zedelenmenin şiddetini ve klinik tablonun siroza ilerlemesini belirler.

#### **Sınıflama**

HBV ortohepadnavirus genusunda Hepadnaviridae ailesindedir. Bu ailenin üyeleri hepatotropik DNA viruslarıdır. RNA ara metabolitli reverse transkripsiyonla replike olurlar. ayw, ayw2, ayw3, ayr, adw2, adw4 ve adr olmak üzere yedi ana serolojik alt tipi bulunur. DNA dizi analizi yapılarak virusun A-H genotipleri içinden hangi genotipe sahip olduğu saptanabilmektedir.

#### **HBV Partikül Yapısı ve Replikasyonu**

HBV vironu 40-45 nm çapındadır(9). Viral yüzey antijenlerine sahip zarfı ve viral kor antijenlerini barındıran ikozahedral yapıdaki nükleokapsidi vardır. Viral nükleokapsidde DNA genomu ile viral polimeraz enzimi proteini yer alır. Persistent HBV enfeksiyonunda hepatositlerin %95’ininden fazlasında yüksek düzeyde viral replikasyon görülür. HBV genomu 3,200 baz çifti uzunluğunda, çift sarmallı DNA yapısındadır. DNA molekülü tama yakın pozitif sarmalıdır.

Viral replikasyon esnasında sarmal transferini kolaylaştıran DR1 ve DR2 olarak adlandırılan iki tekrarlayan dizi bulunur. HBV genomunda negatif sarmalın 5' ucunda DR1 lokalizasyonunda viral polimeraz vardır.

HBV DNA genomunda üç tane kısmen üst üste çakışan "open reading frames" (ORFs) bulunur. C-ORF, kor antijeni (HBc Ag) ile sonradan HBeAg şeklinde sekrete edilen bir pre-core proteinini, S-ORF, PreS/S ve S proteini olarak adlandırılan yüzey antijenlerini (HBsAg) ve P-ORF viral polimeraz enzimini kodlar. Dördüncü ORF ise X-ORF adını alır ve trans aktive edici bir proteini kodlar.

HBV enfeksiyonu sırasında 22 nm'lik sferik partiküllerle yüzey antijeni içeren filamantöz formlar üretilir. Ayrıca enfeksiyonun süregenleşmesinde önemli olan viral kor antijeni formu olan HBe antijeni serumda dolaşır.

## **2.2 KRONİK HBV ENFEKSİYONUNUN KLİNİK PREZENTASYONLARI**

Kronik HBV enfeksiyonu, HBsAg varlığının 6 ay veya daha uzun süreli devam etmesi olarak tanımlanmaktadır(10). İnaktif HBsAg taşıyıcılığı, HBeAg pozitif kronik B hepatiti ve HBeAg negatif kronik B hepatiti olmak üzere üç klinik tablo görülmektedir. Kronik enfeksiyonu olan olguların büyük bir bölümü yıllarca asemptomatik olarak kalır. Bu olguların bazılarında ne klinik ne de biyokimyasal anormallik saptanmamaktadır. Bu olgular, HBsAg taşıyıcısı olarak adlandırılır. Yapılan bir çalışmada bu kriterlere uyan 92 hasta incelenmiş ve bu hastalarda histolojilerinin normal veya minimal değişiklikler gösterdiği görülmüştür. Beş olguda ise hafif şiddette kronik hepatit hali gözlenmiştir. Bir başka çalışmada hafif şiddetli kronik hepatitli olguların 18 yıllık takiplerinde %1 den az oranda siroza gidiş saptanmıştır.

Kronik B hepatitten anlaşılan, süregen HBV enfeksiyonuna bağlı karaciğer biyopsisinde gösterilmiş belirgin kronik nekroinflamasyon ile orta-ileri derecede fibrozis hatta siroz halidir. Orta-şiddetli kronik B hepatitli hastalar da asemptomatik olabilmektedirler. Tanı



anında sarılık nadirdir, assit ve ödem %20'den az olguda, ensefalopati veya varis kanaması %5'den az olguda bildirilmektedir. Aminotransferazlar, bilirubin, gamma globulin seviyeleri hafif ya da belirgin derecede yüksek olabilmektedir. Takiplerde remisyonlarla relapslar görülebilmektedir. Bir alevlenme döneminde aminotransferaz miktarları belirgin artmakta ve sarılık ortaya çıkabilmektedir.

Siroza gidiş prediktörleri arasında hepatik dekompanzasyon, köprüleşme nekrozu veya alfa fetoprotein(>100ng/ml) yüksekliğinin eşlik ettiği tekrarlayan şiddetli akut alevlenmeler, HBeAg klerensi gerçekleşmeyen akut alevlenmeler ile HBeAg'nin tekrar belirdiği HBV reaktivasyonları bulunmaktadır(11).

HBeAg'i negatif kronik B hepatitli olguların serum aminotransferaz paternleri oldukça değişkenlik göstermektedir. Olguların yaklaşık olarak %24'ünde ALT seviyesi yüksek, %48'inde ALT seviyeleri flüktuasyon göstermekte ve %28'inde de ALT değerlerinde intermitant veya tekrarlayan yükselmeler izlenmektedir. Özellikle intermitant ALT yükselmeleri gösteren olgularda ALT değerlerinin normal seyrettiği dönemlerde HBV taşıyıcısı olarak yanlış teşhis konulabilmektedir. Bu yüzden HBsAg'i pozitif olarak saptanan bireylerin aralıklı olarak takip edilmelerinin gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

### **2.3 HBV'NİN DOĞAL SEĞRİ**

Yetişkin dönemde akut HBV enfeksiyonu genellikle geçicidir(12). Bu kişilerde nötralizan antikorlar ortaya çıkarak reenfeksiyona karşı immünite gelişir. Bir grup hastada ise kronik hepatitin eşlik ettiği uzamış/persistan enfeksiyon görülür. HBV enfeksiyonunun kalıcılığı, çoğunlukla yenidoğan enfeksiyonlarında görülmekle birlikte yetişkin enfeksiyonlarında da %5-10 oranında söz konusudur. HBV enfeksiyonunun devamlılığı sonucunda hafif kronik hepatit, şiddetli kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma (HCC) gibi oldukça farklı klinik tablolar meydana gelir.

Sitopatik olmayan virusların klinik seyri ile ilgili yakın zamanda yapılan bir modellemede immün cevabı belirleyen faktörün viral yayılma ile immün sistem değişkenleri arasındaki denge olduğu yönünde iddia bulunmaktadır.

Dünya genelinde 400 milyondan fazla kişi HBV ile enfekte durumdadır. Kronik hepatit ile son dönem karaciğer hastalığının en sık sebebi HBV'dir. Siroz hastalarının üçte biri ve hepatoselüler kanser tanısı almış hastaların yarısından fazlası kronik HBV enfeksiyonu ile enfektedir. Tedavi almamış erken erişkinlik döneminde edinilen kronik HBV enfeksiyonu bulunan olguların yaklaşık %40'ında siroz, karaciğer yetmezliği ve hepatoselüler karsinom geliştiği gözlenmektedir.

### **Siroz ve dekompanze karaciğer hastalığı gelişimi**

Tedavisiz kalan kronik HBV'li olgularda yıllık siroza ilerleme riski %2-6 iken 5 yıllık kümülatif risk yaklaşık %20'dir. Çoğunlukla 40'lı- 50'li yaşlarda asemptomatik olarak tanı konmaktadır. Tedavisiz kompanze HBV'li sirozlarda progresyon yavaştır, 5 yıllık yaşam süresi %80'nin üzerindedir. İlk dekompanzasyondan sonra ise 5 yıllık yaşam süresi %14-35'e gerilemektedir. Kısa dönemde mortalite ile ileri yaş, artmış bilirubin, trombositopeni, hipoalbuminemi, asit, spider nevüs, hepatik ensefalopati gibi hepatik disfonksiyon ve portal hipertansiyon bulguları arasında ilişkiler bulunmuştur. Dekompanze olgularda total bilirubin, albumin ve kreatinin seviyeleri ile skorlanan MELD(model for end stage liver disease) değeri 3 aylık ve 1 yıllık mortaliteyi predikte etmek üzere kullanılmaktadır. Son dönem karaciğer hastalığına gidişte viral ve konak faktörlerinin de etkili olduğu gözlenmiştir.

### **Viral Etkenler**

Viral replikasyon ile HBeAg pozitifliği son dönem karaciğer hastalığına gidişte ve mortalitede etkili bulunmuştur. HBeAg serokonversiyonuyla çoğu olguda HBV DNA miktarı ve nekroinflamatuvar aktivite azalmaktadır. Viral genotip ve genetik varyantların da hastalık

progresyonunda etkili olduğu düşünölmektedir. Genotip C ile kıyasla genotip B'li enfeksiyonların seyri daha iyi olmaktadır. Bu durum Asya kaynaklı çalışmalarda ortaya konya da Batı kaynaklı çalışmalarda fark gösterilmemiştir. Pre-S delesyonlu, precore ve core mutasyonlu varyantların da seğir üzerine etkisi olduğu görölmüştür. Genotip C'li durumlarda bazal core promoter mutasyonu daha sık izlenmektedir. Bu hastalarda HBV viral yükü daha yüksek ve hepatoselöler karsinom gelişimi daha fazladır.

### **Konak Etkenleri**

Yaş artışına paralel olarak siroza gidiş ve dekompanzasyon artmaktadır. Bu durum bir çok farklı coğrafyada gösterilmiştir. Erkek cinsiyetin de progresyon üzerine olumsuz etkisi gözlenmiştir. Erkek kadın oranı asemptomatik taşıyıcılarda 1.2:1, kronik karaciğir hastalığında 6.3:1, hepatoselöler karsinomalı HBV olgularında ise 9.8:1 olarak bulunmuştur.

Fibrozise yatkınlık yapabilecek çeşitli regülatuvar gen poliformizmlerinin de seyir üzerine etkileri bulunduğu gözlenmiştir. Renin anjiotensin aksı, demir alımı, inflamatuvar yollar(TGF- $\alpha$ ...) üzerinde durulan genetik faktörleri arasında yer almaktadır.

## **2.4 HBV MUTANTLARININ KLİNİK ÖNEMİ**

HBV mutantları akut, fulminant ve kronik enfeksiyonlarda izole edilmiştir(13). HBV genomunun dizi analizlerinde bazı bölgelerdeki mutasyonel değışikliklerin konağın immünolojik ve/veya hastalık durumu ile paralellik gösterdiği saptanmıştır. Ancak sebep sonuç ilişkisi her zaman aynı derecede güvenilir değıildir. HBV'nin kompakt genomu olması nedeniyle her mutasyon sonucunda fenotipik bir etki ortaya çıkmaktadır.

Mutasyonlar, tüm viral genlerde ve regülatuvar elemanlarda görölebilmesine karşın en sık zarf ve nükleokapsid gibi yapısal proteinlerinde gelişir. HbsAg'yi kodlayan gen mutasyonlarında anti-HBs antikoruna varlığına rağmen enfeksiyon ya da viral süregenlilik (persistant) görölebilir. Precore/core proteinini kodlayan gen mutasyonlarında HbeAg

kaybına, replikasyona rağmen HbeAg serokonversiyonu eşlik edebilir. Core gen mutasyonlarında T hücre reseptör antagonizması ile immün kaçış ortaya çıkabilir. Polimeraz/reverse transkriptaz gen mutasyonlarında ise viral süregenlik ile nükleozid analoglarına rezistans gelişebilir. Sonuçta HBV mutasyonları enfeksiyonun doğal seyrine, viral klirense ve antiviral cevaba etki edebilir.

## **2.5 HBV ENFEKSİYONUNUN İMMÜNOPATOGENEZİ**

### **HBV'e immün cevap**

HBV'nün direkt konak hücrelerine sitopatik etkisi bulunmadığından, hem karaciğer hastalığından hem de viral klirensten viral antijenlere karşı gelişen immün cevap sorumlu tutulmaktadır(14).

Akut viral enfeksiyonu atlatan kişilerde HBV ile ilgili antijenlere çoklu özgül, poliklonal, sitotoksik T lenfosit cevabının geliştiği saptanmıştır. Akut HBV enfeksiyonunun etkili biçimde kontrol altına alındığı bireylerde HBV'ye özgül sitotoksik T lenfosit(CTL) cevabı incelendiğinde farklı epitoplara (core, polimeraz, zarf proteinleri) karşı güçlü bir immün cevabın geliştiği izlenmiştir(15).

### **AKUT KENDİNİ SINIRLAYAN B HEPATİTİ**

#### **Doğal İmmün Cevap**

Karaciğer, NK, NKT, Kupffer hücreleri gibi doğal bağışıklıkta görevli hücrelerden zengin bir dokudur. Bu hücreler; direkt antiviral etki gösteren birçok proinflamatuvar sitokin salgılayarak doğal immün yanıtı artırır ve devamlılığını sağlarlar. Antijene özgül immün cevabın başlamasında rol alırlar ve o bölgedeki lenfomononükleer hücreleri aktive ederler.

Viral enfeksiyonların ilk savunma hattında enfekte olan hücrelerin kendileri yer alır.(16) Çoğu hücre çift-sarmallı viral RNA'yı tanıdıktan sonra interferon alfa/beta üretimi ile cevap verirler. İnterferon alfa/beta, 2, 5-oligoadenilat sentetaz ve çift sarmallı RNA'ya bağımlı

protein kinazı indükleyerek ve protein sentezini engelleyerek HBV dahil bir çok virusun replikasyonunu inhibe ederler. İnterferon alfa/beta'nın direkt antiviral etkisinin yanısıra makrofajların toplanmasında ve aktive olmasında da rolleri vardır. Aktive olan makrofajlar birçok sitokin ve kemokin salgırlarlar. Bunlar arasında yer alan, önceleri makrofaj inflamatuvar protein 1 alfa olarak adlandırılan CCL3, NK hücrelerinin toplanmasına yol açar. Akut HBV enfeksiyonlarında biriken doğal öldürücü (NK) hücre sayısı inkübasyon safhasında ve klinik bulguların ortaya çıkmasından önce hızlıca artar. NK hücrelerinin önemli bir özelliği, major histokompatibilite sınıf I moleküllerinin upregülasyonundan önce hedef hücreleri tanıyabilmeleridir. NK hücreleri, hedef hücreleri tanıdıktan sonra, HBV ile enfekte hücreleri direkt lizise uğratır ve/veya HBV replikasyonunu interferon alfa ve TNF-alfa üretimi ile azaltır. Ayrıca CCL3, CCL4 ve CCL5 üreterek polimorfonükleer lökositlerin dağılımına ve migrasyonuna yol açar.

Doğal immüitenin ikinci savunma hattında NKT hücreleri yer alır. Bu hücreler, NK ve T hücresi belirteçlerini taşırlar. NKT hücreleri direkt sitotoksik etki gösterirler. Çok miktarda interferon gama ile IL-4 üretirler ve antijene özgül hücre tanıtılmasında görev alırlar.

Enfeksiyonun başlangıç dönemini sitokinler kontrol etmelerine rağmen, viral klerensin tamamlanması ve reinfeksiyondan koruyucu özellik kazanılması için adaptif immün cevabın gelişmesi gerekmektedir. Makrofajlar ve dendritik hücreler viral proteinleri, apoptotik hücre artıklarını fagosite edip, bu antijenleri bölgesel lenf nodlarına taşırlar. Böylece, bölgesel lenf nodlarında antijene özgül adaptif yanıtın gelişmesini sağrlarlar. Ayrıca CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL15 gibi antijene özgül ve özgül olmayan inflamatuvar hücrelerin karaciğere gelmesini sağlayan birçok kemokin salgırlarlar.

Sonuç olarak, doğal immün yanıt, HBV'nin erken dönemde replikasyonunun sitokinlerle ve enfekte hücrelerin lizisi ile kontrol altına alınmasını, intrahepatik immün hücre

aktivasyonunu, sitokin ortamı ile antijene özgül hücrelerin hazırlanmasını, sitokin ve kemokinlerle lenfomononükleer hücre toplanmasını ve MHC sınıf I ekspresyonunu ve HBV ye özgül T hücrelerin antijen tanınmasını artırır.

### **Adaptif İmmün Cevap**

Adaptif hücresel immün yanıt HBV gibi sitopatik olmayan virüslere karşı HBV ile enfekte hücreleri özgül olarak tanıyabildiğinden savunmada ve HBV'ye özgül koruyucu hafızanın gelişmesinde önemlidir(16). HBV'ye karşı özgül antikor paternleri farklı fazlarda ortaya çıkar ve genelde diagnostik amaçla kullanılmaktadır. Akut HBV enfeksiyonunda hepatitis B kor antijenine karşı gelişen antikor ilk göstergedir. HBeAg'ne karşı gelişen antikor, akut kendini sınırlayan hepatit B enfeksiyonunun en erken iyileşme belirteçlerinden biridir. Anti HBe serokonversiyonunun gerçekleşmesi, precore bölgesinde durdurucu kodona ("stop codon") bağlı bir mutasyon olmadığı takdirde daha hafif bir karaciğer hastalığı, ALT'nin normalleşmesi, viral yükün azalması ile beraberdir. Mutant virusla veya "wild" tip ve mutant virus karışımıyla enfekte olan kişilerde HbeAg kaybolmasına rağmen yüksek viral yük devam etmektedir. HBV enfeksiyonunun düzeldiği durumlarda S, preS1 ve preS2 bölgesi glikoproteinlerine karşı nötralizan antikorlar gelişir. Bu durum T hücresine bağımlıdır.

HBV'ye özgül hücresel immün yanıtı CD4+ yardımcı T(Th) ve CD8+ sitotoksik T (CTL) hücreleri sağlar. CD4+ Th hücreleri, antijen sunan hücrelerin üzerinde yer alan MHC sınıf II molekülleriyle birlikte viral peptidleri tanırlar. Buna karşılık HBV'ye özgül CD8+ T hücreleri MHC sınıf I molekülleri ile birlikte endojen sentez edilmeyen proteinleri tanırlar. Bu yüzden antijen sunan hücre ya HBV ile enfekte ya da virus enfekte apoptotik hücreyi fagosite etmiş durumdadır. Apoptotik hücrenin fagosite edilmesiyle "cross-priming" denen sınıf I yolağına antijen salınımı meydana gelir. Özgül T hücre reseptörlerin aktivasyonu ile HBV'ye özgül T hücreleri bir takım immünoreglatuvar fonksiyonlar göstermeye başlarlar.

CD4+T<sub>H</sub> hücreleri B hücrelerinin aktivasyonuna ve farklılaşmasına yardımcı olurlar. Bunun yanı sıra, CD8+T hücre devamlılığını sağlarlar ve dendritik hücrelerin CD8+ efektör T hücrelerinin aktivasyonuna imkan tanırırlar. CD8+ T hücreleriyle CD4+ T hücreleri HBV'nin replikasyonunu ve gen ekspresyonunu inhibe eden IFN $\gamma$  ve TNF $\alpha$  salgırlarlar. Bu iki hücre tipi de direkt HBV ile enfekte hücrelerin lizisine yol açabilirler. Akut HBV enfeksiyonunun klerensi HBV proteinlerinin tüm epitolarına karşı CD4+ ve CD8+ T hücre cevabının şiddeti, poliklonal ve mültispesifik olması ile birlikte görülür.

Bu hücresele immün cevap enfeksiyonun ilk haftalarından itibaren, serum ALT değerinin yükselmesinden, HbeAg klirensinden ve nötralizan antikorların ortaya çıkışından önce periferik kanda saptanabilir. İlginç olarak hepatit B'yi tamamen geçiren olguların çoğu gereğinden fazla belirgin bir HBV'ye özgül hücresele immün cevap gösterirler.

İlk olarak CD4+ ve CD8+ T hücreleri HBV proteinlerinin tüm epitolarını hedeflerler. İkinci olarak, birçok HBV epitoları süpertip ailesine ait birçok HLA alelleri bağlamında tanınırlar. Üçüncü olarak, HLA alellerinin heterozigotluğu immün sisteme sunulan epitop miktarını artırır ve HBV kontrolünü kolaylaştırır. Dördüncü olarak, her bir epitop çok sayıda T hücre klonları tarafından farklı T hücre reseptörleriyle tanınabilmektedir. Bu durum HBV'ye özgül T hücre cevabının poliklonalitesini gösterir. Kronik enfeksiyonu olan hastalarda bu cevaplar saptanamamaktadır. HBV'ye özgül CD4+ ve CD8+ cevabı daha zayıf ortaya çıkmaktadır. Bu şekildeki gözlemler, şiddetli ve mültispesifik T hücresi cevabı ile HBV enfeksiyon klirensinin beraber olduğunu tespit ettirmektedir.

Antijene özgül adaptif olarak CTL ve hepatosit transferinin iki hızlı etkisi izlenir. Birincisi CD8+ T hücreleri hepatositlerde apoptozisi uyarırlar ve asidofilik Councilman cisimciklerinin oluşmasına neden olurlar. Bu sitopatik etki hepatositele CD8+ T hücresinin direkt ilişkisini gerektirdiğinden az sayıdaki hepatositler üzerinde görülmektedir. Ayrıca

hücre ölümü sitoplazmik HBV nükleokapsidlerinin ve HBV DNA replikatif ara metabolitlerinin yıkılmasını sağlamamaktadır. Dolayısıyla HBV ile enfekte hepatositlerin direkt lizisi relatif olarak etkisizdir. İkincisi CD8+ T hücreleri HBV'yi hepatositleri öldürmeden de tedavi edebilirler. HBV nükleokapsid partikülleri, replikatif viral ara ürünler, virusun transkripsiyonel yapısı, episomal ccc HBV DNA; IFNgama ve TNFalfa etkilerine duyarlıdır. İntrahepatik T hücreleri az miktarda sitokin salınımına yol açsalar da lokal HBV replikasyonunu engelleyebilirler.

### **Replikasyonun Hücresel Olmayan Yolla Kontrolü**

HBV replikasyonunu engelleyen moleküler mekanizmalar nelerdir diye inceleyecek olursak bunlardan birincisi, virüsle enfekte olan konak hücresinin sitokin aracılı antiviral etkiye duyarlılığının farklı farklı olmasıdır(17). Burda efektör hücre tipi de önemlidir. NKT hücreleri ile profesyonel antijen sunan hücreler antiviral etkilerini interferon alfa/beta üzerinden, CD8+ T hücreleri ise en çok etkisini interferon gama üzerinden yapar. Üçüncü mekanizma interferon alfa/beta ve interferon gamanın enfekte hücrelerde farklı antiviral yollarını aktive etmeleridir. İnterferon alfa/beta RNA içerikli HBV kapsidlerini inhibe ederler ve/veya destabilizasyonunu sağlarlar. İlave olarak, interferon gama, nitrik oksit indüksiyonu ile de parakrin ve otokrin antiviral etki gösterirler. İnterferon gama ve TNFalfa'ya cevap olarak indüklenebilir nitrik oksit yapımı hepatosit ve makrofajlarda upregüle olur.

### **Hepatik nekroinflamatuvar zedelenmenin gelişmesi**

Sitokin aracılı HBV replikasyon azalması inkübasyon fazında ve karaciğer hastalığının serolojik ve histolojik bulgularının olmadığı dönemde meydana gelmektedir. Klinik akut hepatit semptom ve bulgularını ne ortaya çıkarır? Hayvan modellerinde akut hepatite eşlik eden çoğu nekroinflamasyonun, antijenden bağımsız HBV'ye özgül T hücresi



infiltrasyonunun artması ile ilişkili olduğu gözlenmiştir(18). Antijenden bağımsız olan bu olay kemotaktik sitokinlerle toplanan antijene özgül olmayan T hücreler ve nötrofiller aracılığıyla gerçekleşir. Hayvan modellerinde HBs özgül CD8+ T hücresi enjeksiyonunu takiben 4-12 saat içinde antijene özgül olmayan inflamatuvar hücrelerin karaciğerde toplandığı saptanmıştır. Bu hücreler arasında makrofajlar, NK hücreleri, T hücreleri ve nötrofiller bulunmaktadır. Bu hücrelerin çoğu histopatolojik bulguların oluşmasını sağlayan nekroinflamatuvar infiltratları meydana getirmektedirler.

Antijene özgül olmayan intrahepatik immün cevabın artmasına yol açan mekanizmalar nelerdir? İnterferon gama, antiviral etkilerinin yanısıra makrofajları aktive eder ve TNFalfa'ya karşı hepatosit duyarlılığını artırır(19). Ayrıca T hücrelerini, nötrofilleri, NK ve NKT hücrelerini çağıran kemokinlerin hepatosit, sinüzoidal endotelial hücreleri ve makrofajlar tarafından yapımını uyarır. Viral enfeksiyon olmasa dahi IFNgama'nın sürekli ekspresyonu süregelen olarak lenfomononükleer hücre birikmesine ve kronik aktif hepatit tablosuna yol açar.

İnflamatuvar hücrelerin karaciğere migrasyonu kemokinler aracılığıyla gerçekleşir. Kemokinler 8-12 kDa ağırlığında olan lökosit integrinlerini aktive eder. IFNgama NKT, NK ve Th1/Tc1 T hücrelerince salgılanır ve CXCL9, CXCL10, CXCL11 gibi çeşitli kemokin yapımlarını indükler. Bu kemokinler CXC ailesine ait olup, sinüzoidal endotelial hücreler, makrofajlar ve hepatositlerce üretilirler ve CXCR3 reseptörüne bağlanırlar. Bu reseptör periferik T hücrelerinden ziyade karaciğeri infiltre eden T hücrelerince yüksek oranda eksprese edilirler. Ayrıca CCL3, CCL4 ve CCL5 inflame karaciğerde upregüle edilir.

### **Hepatitin Düzelməsi**

Akut B hepatitinin düzelmesinden sonra HBV'ye özgül CD4+ ve CD8+ T hücreleri hem kanda hem de karaciğerde hızlıca azalır. Bunda anerji indüksiyonunun etkili olduğuna dair gözlemler bulunmaktadır.

HBV'nin hangi organ veya dokularda kaldığı bilinmemektedir. Kronik B hepatitinde virusun replikatif formlarına, safra yolu epitelinde, düz kas dokusunda, pankreasta, böbrekte, deride, beyinde, endokrin dokuda, lenf nodlarında, replikatif olmayan formları ise immün sistemde tespit edilmiştir. Renal tübüler epitel, koroid pleksus gibi bazı bölgelerde T hücre girişi olmamakta dolayısıyla immüniteden korunmuş alanlar vardır. HBV'ye özgül antikorlar ve T hücreleri viral yayılımı engeller, dolayısıyla kalan virüsü kontrol ederler.

## 2.6 KRONİK B HEPATİTİ

### **Kronik Enfeksiyonun Gelişimi**

Tüm HBV ile kronik enfekte kişiler az miktarda, dar odaklı ve zayıf HBV'ye özgül T hücre cevabı gösterirler(20). Bu hastaların enfeksiyonun akut döneminde güçlü cevap geliştirip geliştirmedikleri bilinmemektedir. Erken T hücre cevabının daha az epitopa veya dominant epitoplara yerine subdominant epitoplara yönelik olup olmadığı da açık değildir. Erken dönemde oluşan immün cevabın düşük regülasyonlu mu ya da yüksek HbeAg sekresyonu karşısında yetersiz kalıp kalmadığı da bilinmemektedir.

Persistent HBV enfeksiyonunu açıklayan çeşitli görüşler geliştirilmiştir. Birincisi, akut hepatitteki viral klerensi sağlayan aynı mekanizma kronik olarak enfekte hastaların tam iyileşmesini engellemektedir. Kalitatif ve kantitatif olarak eksik T hücre cevabının antijene sunumu ile HBV replikasyonunu kısmi azaltması immün tanımadan enfekte hücrelerin kaçmasını sağlamaktadır.

T hücrelerinin efektör fonksiyonları belli bir hiyerarşiyi takip etmektedir. Düşük peptid konsantrasyonları ile zayıf T hücre reseptör agonistleri CD8+ T hücrelerinde sitotoksik efektör fonksiyonları uyarırken, yüksek peptid konsantrasyonları IFNgama üretimi ve IL-2 duyarlılığı için gereklidir. En yüksek konsantrasyonlarda T hücre proliferasyonu görülür. Dolayısıyla yetersiz aktive CD8+ T hücreleri karaciğer doku zedelenmesi yapmasına karşın,

sitokin aracılı mekanizmalarla enfeksiyonu temizleyemezler. İkincisi, konak immün cevabı aşan HBV replikasyon kinetiği, hızlıca çoğu hepatositleri enfekte etmekte, HBV'ye özgül T hücrelerinin ulaşamadığı ekstrahepatik bölgelere HBV yayılmasına neden olmaktadır. Üçüncüsü, T hücre tanıma bölgelerindeki mutasyonlar nedeniyle viral kaçışlar söz konusudur. T hücre epitoplarındaki varyasyonlar kronik HBV enfeksiyonlarında gösterilmiştir.

T hücre epitopları içerisindeki varyant viral sekansları proliferasyon, sitokin sekresyonu gibi birçok T hücresi fonksiyonunu bozabilir, orijinal epitoplara karşı gelişen immün cevabı parsiyel veya tümünden inhibe edebilir. HBV çok farklı immün cevaplardan kurtulmak üzere çok çeşitli epitoplarda mutasyon göstermektedir.

Vertikal bulaşta da farklı mekanizmalar söz konusudur. Neonatal immün tolerans HBV enfeksiyonuna da tolerans sağlar. Santral delesyon veya antijene özgül T hücrelerine anergi pek mümkün gözükmemektedir. HbeAg'nin tolerans durumu ise tartışmalıdır.

### **Kronik Hepatitte İntrahepatik İmmün Cevap**

HBV'ye özgül immün cevap periferik kanda zayıf, hatta ölçüm sınırlarının altında olmasına rağmen HBV'ye özgül T hücre klonları karaciğer biyopsilerinde izole edilebilir. Süregen HBV'ye özgül T hücreleriyle özgül olmayan iltihabi hücre birikimleri, karaciğerde artan derecelerde nekroinflamatuvar zedelenmeye yol açar. Kronik hepatit şiddetini yansıtan da bu intrahepatik inflamatuvar lökosit infiltrasyonudur.

CD4+ ve CD8+ T hücrelerine ilaveten B hücreleri de portal alanlarda ve sinüzoidlerde lenfoid folliküller oluştururlar. Dolayısıyla HBV'ye özgül hücre sel cevap HBV klirensini sağlayamamasına rağmen hepatik zedelenme yapacak kadar güçlü olduğu söylenebilir.

### **Kronik HBV enfeksiyonun akut alevlenmelerinde HBV'nin genomik varyasyonu**

Akut alevlenme özellikle HBeAg pozitif kronik B hepatitlilerde sık karşılaşılan bir durumdur(21). Bu durum karaciğer hastalığının ilerlemesine neden olurken şiddetli olgularda

hepatik yetmezliğe yol açabilir. Akut alevlenme kendiliğinden veya immün sisteme etkili medikal tedaviler sonucu gelişebilir. Virüs ile konağın immün cevap arasındaki dengenin bozulması bu durumun gelişmesini sağlayabilir diyebiliriz.

Bu dönemde çalışmalar HBcAg ve HbeAg'ine karşı T hücre cevabının arttığını göstermektedir. Kronik B hepatitlerin akut alevlenmelerini takiben core, core promoter veya polimeraz HBV genomlarında varyasyonlar gözlenmiştir. Bu yeni viral varyantlar enfeksiyonun ilk dönemlerinde gelişen immün cevaptan kaçabilmektedirler. Kronik HBV enfeksiyonlu akut atak geçirenlerin %93 inde viral yük zirvesi serum alanine aminotransferaz zirvesinden önce ortaya çıkar. Geriye kalan küçük bölümde ise zirveler çakışır.

Akut atağın hemen öncesi veya sırasındaki artan viral genom bazaldeki viral dizisi ile uyumludur. Viral DNA dizisinin ortalama nükleotid değişimi, zirve HBV DNA'nınki ile benzerdir. Ayrıca akut alevlenme öncesinde viral replikasyon artışına viral DNA dizi değişiklikleri nadiren eşlik eder. Bu gözlem virüs ile konak arasındaki toleransın bozulmasına, viral genomdan ziyade konağın immün cevabı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Üstelik, tüm alevlenme döneminde viral genomun %50'si değişmeden kalır. Nükleotid dizi değişiklikleri tüm HBV genomunda görülmesine karşın en çok kor ve yüzey genlerinde gelişmektedir. Bu da, akut alevlenmeden sonra replikasyon potansiyelinde bir artışı gerektirmez.

### **Kronik Hepatit Ve Siroza Gidiş Mekanizmaları**

Kronik karaciğer hastalığı viral veya farklı bir zedeleyici etken ile hepatik stelat hücrelerini aktive etmesi ile başlar(21). Bunu takiben "Transforming growth faktör beta" ve "platelet-derived growth faktör" gibi profibrojenik mediatörler sekrete edilirler. Artmış inflamatuvar sitokinler İto hücrelerinde fenotipik değişiklik yaratarak myofibroblastlara dönüşümü sağlarlar ve bu hücreler de profibrotik sitokin salınımları yaparlar. Kronik TGF- $\beta$

ve PDFG ile TNF- $\alpha$ , interlökin-1  $\beta$ , interlökin-6 gibi diğer proinflamatuvar mediatörler bağ dokusu birikimine, lobüler ve mikrovasküler hepatik yapının progresif bozulmasına yol açarlar. Sonuçta portal mikrosirkülasyonda hipertansiyon hali gelişir. Ayrıca hepatik vazodilatatörlerle vazokonstriktörler arasındaki dengesizlik de sinüzoidal mikrosirkülasyonda rezistans artışına ek katkı sağlar. Bu mediatörlerin esas hedefi vasküler hepatik rezistansını ayarlayan hepatik stelat hücreleridir. Bu bağlamda hepatik stelat hücre aktivasyonuna bağlı kalsiyum kanalları açılımla hepatik sinüzoidler konstriktif eyleme geçerler. Aktive olduklarında uzun üreli sinüzoidal rezistans sağlayarak portal hipertansiyona neden olurlar.

Sürengen olan bu aktivite hepatik fibrozisin gelişimine öncülük eder. Dolayısıyla sadece fibrogenesis değil, lokal endotelin, vazopressin, anjiotensin gibi çeşitli vazokonstriktif maddelerin artışlarıyla prostasiklin başta olmak üzere çeşitli vazodilatatör mediatörlerin azalması hepatik skleroza ve portal hipertansiyon gelişimine yol açar. Ayrıca endotelinin hepatik arter vazokonstriksiyonuna yol açarak hepatositlerde iskemik nekroz geliştirdiği de gösterilmiştir. Mantıken beklenen şekilde portal mikrosirkülasyon ve hepatik arterdeki vazokonstriksiyonu karşılamak üzere nitrik oksit, glukagon gibi çeşitli vazodilatatör maddeler periferde sentezlenerek güçlü splanknik vazodilatasyona yol açarlar. Ancak bu kompanzasyon mekanizması portal mikrosirkülasyondaki vazokonstriksiyonu karşılamakta yetersiz kaldığı gibi yol açtığı splanknik vazodilatasyon ve hiperdinamik sirkülasyon sonucunda portal hipertansiyona yol açar.

Sirozun temel göstergesi nodül formasyonun ve fibrozisin eşlik ettiği hepatik yapının bozulmasıdır. Beraberinde inflamasyon ve hücre zedelenmesinin olup olmasına göre aktif veya inaktif şekilde nitelendirilebilir. Kronikleşmeye yol açan başlıca neden, kronik viral enfeksiyona sekonder devam eden karaciğer hücre zedelenmesidir. Disse aralığında kollajen birikimine kapillerizasyon denmektedir. Bu durum besin ile oksijen diffüzyonunu bozar.

Mikroanatominin bozulması vasküler desteğin de bozulmasına yol açar. Yetersiz perfüzyon da rejenerasyonun aksamasına neden olur. Rejenere olan hepatositler nodül gelişimine öncülük ederler.

## 2.7 HBV HEPATİTİNDE SİTOKİNLER

Kronik hepatit yetersiz viral klirens ve hepatosit zedelenmesi ile karakterizedir. HBV'nin sitopatik etkisi olmadığı varsayıldığı için hepatoselüler hasardan temel olarak hücresel immünite sorumlu tutulmaktadır. HBV'nin immün sistemden kurtulma yolları tam anlamıyla bilinmese de T hücre cevabındaki bir yetersizlik başlıca sebep olarak kabul edilmektedir(22). Th1 tip paternde immun yanıt, viral replikasyonun durdurulması ve viral klirensin sağlanması açısından önemlidir. HBV eliminasyonu için IFN- $\gamma$ , sitotoksik T hücre aktivasyonu, direkt anti-viral aktivite, MHC gen ekspresyonu ve makrofaj uyarımı yapmaktadır. Transjenik fare modelinde IFN- $\gamma$  sekrete eden sitotoksik T hücre transferinin sitolizis yapmadan HBV replikasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir.

Th1 baskın sitokin profillerde akut sınırlayıcı hepatitis B gelişme ihtimalinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Çoğu akut hepatitte HBsAg epitoplarına sitotoksik T lenfosit cevabı gelişirken, kronik hepatitte bu durum izlenmemektedir. Antijen özgül sitotoksik T lenfositler ile antijene özgül olmayan makrofajların IFN- $\gamma$ , IL-2 ve TNF- $\alpha$  salınımına sekonder antiviral etkinin geliştiği düşünülmektedir. Bu sitokinler, sitolitik olmayan mekanizmalarla HBV gen ekspresyonunu baskılayarak HBV nükleokapsid partiküllerini ortadan kaldırırlar ve viral RNA'nın stabilizasyonunu bozarlar. Sonuç olarak, enfekte hepatosit yüzeyinde HBV antijenlerinin sitotoksik T lenfositlerince tanınmasından sonra iki farklı fonksiyon gelişmektedir. Az miktarda enfekte olan hepatosit parçalanmakta ve ortama salınan sitokinlerle sitolizis gelişmeden antiviral etki ortaya çıkmaktadır.

Th2 sitokin yönünde oluşan bir paternde ise progresif virüs enfeksiyonu ortaya çıkar. Beraberinde Th3 hücrelerinin aktivasyonu ise kronik HBV enfeksiyonunda immün yanıtın azalmasına yol açarak immüntolerans durumuna katkı sağlar. Th2 tip yanıtta viral kalıcılık ile muhtemelen daha kolay mutasyon geçirmekte, T hücreli immün ataktan daha kolay kurtulmaktadır. Süregen enfeksiyon inflamasyonun uzamasına ve uzun dönemde kronik karaciğer hastalığı gelişimine yol açmaktadır.

IL-12, makrofaj ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerce sekrete edilmekte ve hem doğal hem de adaptif immünyetede rol almaktadır. Th1 hücre gelişiminde IL-12'nin önemli etkisinin olduğuna inanılmaktadır. IL-12, Th1 ile IL-2'nin sinerjistik etkileşimini arttırdığı gibi Th1 yanıtının devamında ve TCR-CD3 kompleksini stimüle ederek IFN- $\gamma$  üretiminin artmasında da görev almaktadır. IL-12'nin, viral klerensle korele olduğu da saptanmıştır. HBV ile enfekte hastalarda virus klirensi olanlarda IL-12 arttığı gözlenmiştir. ALT alevlenmesinden hemen sonra HBeAg serokonversiyonuna denk gelen zamanda IL-12'nin zirve değere ulaştığı görülmüştür. IFN- $\alpha$  tedavisiyle kronik B hepatitinde IL-12'nin IFN- $\gamma$  sekresyonunu artırıcı etkisinin daha da arttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla kronik hepatitlerde IFN- $\alpha$  ve IL-12 tedavi etkinliğini artıran moleküller olarak değerlendirilebilir. Fulminant B hepatitli hayvan modellerinde proinflamatuvar IL-12 ve IFN- $\gamma$  etkisini dengeleyemeyen anti-inflamatuvar IL-10 artışı söz konusudur ve gelişen nekroinflamatuvar reaksiyon masif hepatik hasara yol açmaktadır.

## 2.8 STAT

Janus kinaz (Jak) – STAT (Signal transduction and activators of transcription proteins) yolağının keşfedilişi 1990'lı yılların başlarında interferonun gen üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar esnasında gerçekleşmiştir. Daha sonraki yıllarda birden fazla tipte ve bir çok sitokin ve büyüme faktörünün ortak kullandıkları hücre içi iletim yolları oldukları

anlaşımıştır (Tablo 1). STAT proteinleri, sitokin sinyalini intraselüler zincirin bir parçasından aldıktan sonra nükleusa geçip transkripsiyon faktörü olarak çalışırlar(23).

Memeli Jak ailesinde Jak1, Jak2, Jak3 ve tirozin kinaz 2 olmak üzere 4 üye bulunmaktadır(24). Jaklar sitokin reseptörleriyle birlikte bulunurlar. Ligandının bağlanmasıyla Jak ile reseptör bağlantılarının arttığı ile ilgili de gözlem yapılmıştır. Ligandın reseptöre oturması reseptörde konformasyonel değişikliğe yol açar. Bu da Jak kinaz alanında tirozin kısımlarının fosforlanmasına sebep olmaktadır. Bir başka deyişle diğer tirozin kinazlar gibi Jaklar otofosforilasyonla aktive olurlar. Jak1, Jak2, Tyk2 yaygın olarak, Jak3 ise başlıca hematopoetik doku hücrelerinde bulunurlar. Janus kinazlar reseptörsüz tirozin kinazlardır.

**Tablo 1.** Sitokinler ve hücre içi sinyal ilteminde etkilenen STAT tipleri.

STAT	SİTOKİN
STAT1	İnterferon- $\alpha/\beta,\gamma$
STAT2	İnterferon- $\alpha/\beta$
STAT3	IL-2, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-15, IL-20, EGF, OSM, G-CSF, TPO, LIF, GH
STAT4	IL-12
STAT5A/5B	IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15, G-CSF, GM-CSF, EPO, TPO, GH, PRL
STAT6	IL-4, IL-13

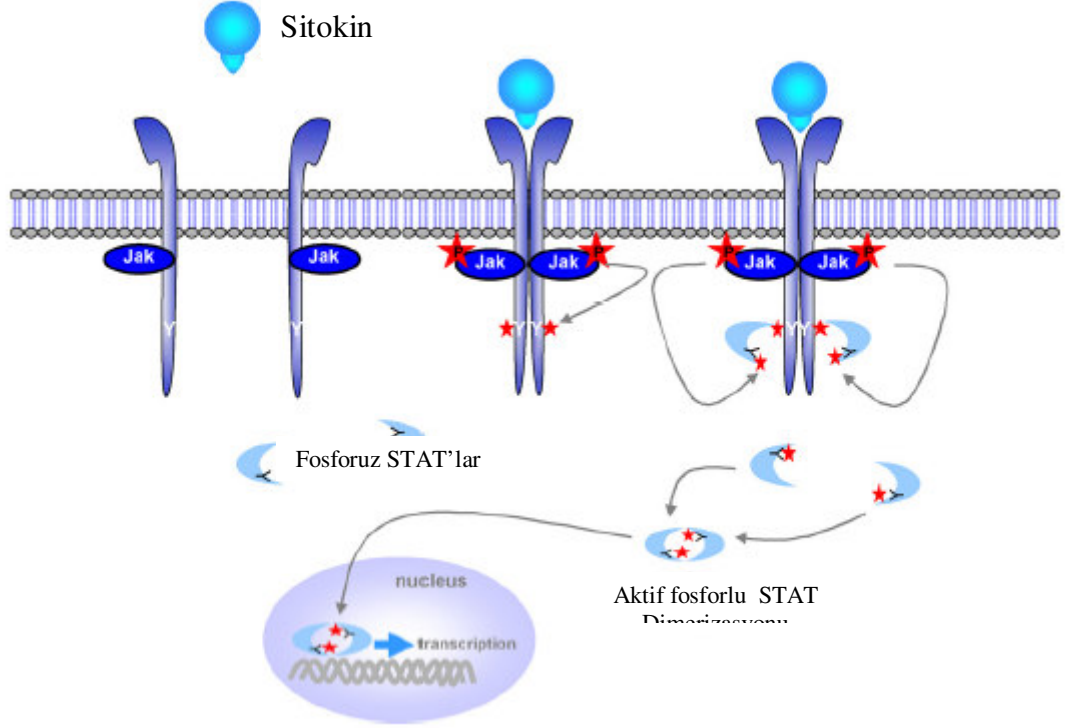
STAT lar ise STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6 olmak üzere 7 üyeden meydana gelir. Bu moleküller, yapısal açıdan ortak bölgeler içermektedirler(25). Hücre içinde STAT proteinleri, stimüle edilmeden önceki fosforlanmamış STAT proteini ve stimülasyon sonrası tirozin fosforilasyonu yapılmış STAT proteini olmak üzere iki formda bulunurlar. STAT proteinleri sitoplazmadaki



intraselüler reseptör zincirinden sitokin sinyallerini alıp nükleusa taşır ve burada transkripsiyon faktörleri olarak görev yaparlar. Genetik tabanlı çalışmalarda Jak ve STAT proteinlerinin özellikle immünolojik yanıtta devreye girdiği anlaşılmıştır.

### **Sinyal iletimi**

Sinyal iletimindeki ilk basamak, bir ligandın hücre yüzeyinde bulunan reseptörün alfa alt ünitesine bağlanmasıdır(26). Ligand ile bağlı altünite, beta altüniteyle oligomerizasyon oluşturur. Bu oligomerizasyon reseptörle ilişkili Janus tirozin kinaz fosforilasyonunu aktive eder. Aktive Jaklar sitoplazmik reseptör kısımda fosforilasyon yaparlar. Fosforile tirozin alanları, membranda veya sitoplazmik kompartmanda yer alan src homoloji 2 ve fosfotirozil bağlayan domain için yanaşma yerleri oluştururlar. STAT proteini bu bölgeye bağlanır ve fosforile edildikten sonra reseptörden ayrılır. Sitoplazmada iki adet fosforile olan STAT birleşerek dimer oluşturur ve nükleusa yönelirler. Nükleusa geçiş nükleer por kompleksleriyle meydana gelir. Bunlar diffüzyon bariyerleridir ve sadece iyonlar ile ağırlığı az olan küçük moleküllerin geçişine izin verirler. STAT monomerlerinin ağırlığı 85 kilo daltondan azdır. Nükleer porlardan protein geçişleri taşıyıcı bağımlı ve bağımsız şekillerde gerçekleşir. Fosforile olmamış STAT nükleusa karyoferinden bağımsız bir mekanizmayla girip, nükleustan klasik eksportin bağımlı mekanizmayla çıkabilir. Ligand reseptör kompleksiyle bir kısım STAT proteini fosforilasyon sonrası dimerize olur. Bu yapısal değişim karyoferin bağımlı nükleer porların lokalize edilmesiyle devam eder. Fosforile STAT proteini nükleusa geçişte bu yolu kullanır.

**Resim 1.** STAT ileti sistemi<sup>26</sup>.

### İzoformları

STAT proteinleri 700-850 amino asit uzunluğunda, bir çok fonksiyonel alanları aynı olan proteinlerdir. STAT proteinleri, N-alanı/STAT proteini etkileşim alanı, coiled-coil alanı/STAT all-alfa alanı, DNA bağlayan alan, bağlantı alanı, SH2 alanı, transaktivasyon alanı olmak üzere çeşitli fonksiyonel bölgelere sahiptir(27). Tüm STAT'ların C-terminalinde aktivasyonla fosforile olan ve dimer eşiyle SH2 alanında moleküller arası bağlantı kuran tirozin yuvası bulunmaktadır. Ayrıca STAT2 ve STAT6 dışında tüm STAT'larda C-terminalinde fosfo-amino asit yuvası ile transaktivasyon alanında fosfo-serin yuvası görülmektedir. Tam uzunluktaki STAT'lara  $\alpha$  izoform, mRNA kıyımından veya transizyonel işlem sonrası proteolizise uğrayan kısa STAT'lara  $\beta$ ,  $\gamma$  veya  $\delta$  izoform denmektedir.

### **STAT Proteinlerinin Fonksiyonu**

STAT proteinlerinin alanlarından N-alanı dimerizasyon, tetramizasyon, protein-protein etkileşiminde, coiled-coil alanı diğer proteinlerle etkileşiminde görev almaktadır(25, 28). STAT3'ün coiled-coil alanı reseptöre bağlanma için önemlidir. DNA bağlayan alan DNA'ya bağlanmada görevlidir. Nükleer translokasyonda da etkilidir. Linker alan transkripsiyonel aktivasyonla ve protein-protein etkileşimle ilgilidir. SH2 alanı reseptör birlikteliği ile fosfo-dimer oluşumunda hayati öneme sahiptir. SH2 alanı en çok, transkripsiyonel alan en az korunmuş alanlardır. Nükleer giriş ve çıkışta da çeşitli alanların önemi vardır. Örneğin STAT1'de N-alanı, DNA bağlayan alan importin5 $\alpha$ 5/NPI-1 ile etkileşime girmektedir.

### **Fosforile STAT'lar**

Aktivasyona bağlı olarak STAT'lar hızlıca fosforile olduktan sonra nükleusa geçerler, ve hedef DNA dizisinde gen aktivasyonu için DNA'ya bağlanarak transkripsiyon faktörü gibi çalışırlar(25, 29). STAT'ların bağlandığı elemanlar başlıca iki tiptir. Birincisi ISRE olup IFN sinyalizasyonunda rol almaktadır. İkincisi GAS'dir ve bir çok STAT tipiyle etkileşime girebilmektedir. GAS'ın varyantları bulunmaktadır. STAT1'in hedef genleri arasında IRF-1, 6-16, 9-27, 2-5A sentetaz Ly-6E yer almaktadır. STAT3'ün transkripsiyona sebep olduğu genler arasında  $\alpha$ 2-makroglobulin, fibrinojen,  $\alpha$ 1asit glikoprotein, cyclin D1, Bcl-X<sub>L</sub> ve mcl-1 bulunmaktadır. STAT5 ile ilişkili genler ise  $\beta$ -casein, Bcl-X<sub>L</sub> ve Cyclin D1'dir. Aktive olan STAT'lar negatif feedback yapan SOCS/CIS ekspresyonunu da indüklerler.

Bazı kanser tiplerinde bir takım istirahat STAT veya fosfo-STAT upregülasyonları süreklilik göstermektedir. Meme, özofagus, baş ve boyun tümörleri, prostat kanseri ile lösemide fosfo-STAT1, fosfo-STAT3 ve fosfo-STAT5 aktivitelerinin süregen artmış olduğu bulunmuştur. Ayrıca mutant STAT3'ün onkogen olduğu ispatlanmıştır.

### **Fosforile olmamış STAT'lar**

Stimülasyon öncesi STAT proteinleri homodimer, heterodimer veya steatozom denilen multimerik kompleks formunda sitoplazmada konumlanırlar(25, 30, 31). STAT1ve STAT2 ile, STAT1 ve STAT3 ile ve STAT3 STAT3 ile birbirlerine tutundukları gözlenmiştir. Fosforilasyondan bağımsız dimer formları da görülebilmektedir. STAT1 Y701F mutanıtı STAT2 ile dimer yaptığı saptanmıştır. İlginç olarak STAT1 eksik U3A hücrelerinde Y701F STAT1 mutantına rastlanmaktadır. Daha da ilginç fosforile olmamış STAT mutantları ile ilgili STAT proteini eksik modellerde benzer gen stimülasyonlarının yapabildiklerinin gözlenmesidir. Bu mutantlar, fosfo-STAT proteinlerinin transkripsiyon esnasındaki GAS'a bağlanma şeklinde değil de muhtemelen DNA'ya bağlanmadan ko-regülatuvar etkiyle gen indüksiyonunu sağlarlar.

Fosfo-STAT'lar gibi fosforlanmamış STAT'ların da transkripsiyonel ko-regülatuvar etkisinin bulunduğu gözlenmiştir. Yakın zamanlı bir çalışmada fosforlanmamış STAT3'ün mikrotübüler sabitleyici olarak görev yaptığı saptanmıştır (31).

STAT proteinlerinin üstlendikleri fizyolojik rollere ilişkin en önemli bilgiler ilgili STAT proteininin ortadan kaldırılmış fare modellerinden elde edilmiştir. STAT1'i yok edilmiş hayvan modelinde embriyonel gelişim açısından normal olmalarına karşın interferon sinyalizasyon kusuruna bağlı virus ve diğer mikroorganizmalara karşı artmış duyarlılık gözlenmiştir. Ayrıca kimyasal uyarımlı karsinogeneze yatkınlık tümör süpresyonundaki etkisini işaret etmektedir. STAT2'de interferon sinyalizasyonunda görev aldığından STAT2 yok edilmiş farelerde viral enfeksiyona artmış duyarlılık izlenmektedir. STAT3'ün ise deride, meme dokusunda, zedelenme sonrası motor nöron fonksiyonunda ve hepatik mitogeneziste olmak üzere farklı dokularda birçok fonksiyona sahip olduğu saptanmıştır.

STAT4 ve STAT6 selektif T hücresi farklılaşmasında etkili olmaktadır. STAT4'ün ortadan kaldırıldığı farelerde Th1 paternine farklılaşmayı sağlamada kritik öneme sahip IL-12'ye yanıtın bozulduğu gözlenmiştir. Bu farelerin Th1 yanıtının karakteristik olduğu otoimmün hastalıkların gelişimine direnç gösterdikleri ve hücre içi yerleşim gösteren mikroorganizmalara duyarlılıklarının arttığı gözlenmiştir. STAT 6'nın yok edildiği hayvan modellerinde IL-4'e yanıtın kaybolduğu ve Th2 farklılaşmasında anormalliklerin görüldüğü saptanmıştır. STAT5 ise büyüme hormonu ile prolaktin sinyalizasyonunda görev almaktadır. STAT5a ve STAT5b birlikte yok edilmiş farelerde ilginç olarak bu moleküllerin T hücre proliferasyonunda ve aktivasyonunda etkili olduğu bulunmuştur. Bu moleküllerin tam yok edilmiş farelerin perinatal dönemde öldüğü görülmüştür. Yine bu farelerde ciddi kombine immün yetmezlik fenotipinin ortaya çıktığı saptanmıştır.

### **Jak STAT Sinyalizasyonunun Negatif Yönlü Regülasyonu**

Sitokin sinyalleri, aşırı sinyalizasyona bağlı gelişebilecek otoimmün hastalıklardan ya da neoplastik transformasyondan korunma amacıyla çeşitli regülatuar mekanizmalarla kontrol edilmektedir(32). Belli başlı kontrol seviyeleri arasında reseptör internalizasyonu, fosfotirozin fosfatazlar, aktive STAT ailesi protein inhibitörleri(PIAS), STAT-interacting LIM protein (SLIM), ubiquitin ligaz, sitokin sinyalizasyonu süpresör proteinleri(SOCS) ailesi ekspresyonunun indüksiyonu yer alır.

### ***Tirozin Fosfatazlar***

SHP1 tirozin fosfataz iki SH2 alanı içeren aktive reseptörler ile Jak2 üzerindeki fosfotirozinaza etki edebilen bir fosfatazdır. SHP1 yok edilmiş hücrelerde GM-CSF, IL-3 gibi sitokinlere karşı aşırı cevap hali gözlenmiştir.

CD45 veya lökosit ortak antijeni, sitoplazmik alanda fosfataz aktivitesi olan bir transmembranöz proteindir. CD45 eksikliği sağlanmış farelerde Jak'larda ve ilgili STAT

yolağında çeşitli sitokinlere (IL-3, IL-4, EPO...) karşı hiperaktivasyon olduğu izlenmiştir. PTP1B ile TC-PTP yüksek düzeyde DNA dizi homolojisi gösteren fosfatazlardır. PTP1B, Jak2 ve TYK2 üzerine, TC-PTP ise Jak ve Jak2 üzerine reglatuvar etkisi bulunmaktadır.

### ***PIAS ve SLIM***

Memeli PIAS protein ailesinin STAT sinyalizasyonu yanı sıra nükleer faktör kapa B, SMAD'lar ve p53 gibi transkripsiyon faktörlerini de regüle ettiği anlaşılmıştır(33). PIAS1, PIAS3, PIASx ve PIASy olmak üzere dört üyesi bulunmaktadır. Son dönem çalışmalarda PIAS üyelerinin küçük ubiquitin benzeri modifier (SUMO) E3-ligaz aktivite gösterdikleri saptanmıştır. PIAS proteinleri STAT aktivitesini çeşitli yollarla değiştirebilmektedirler. Birincisi, DNA'ya bağlanmayı inhibe edebilmektedirler. İkincisi, ko-reglatuvar moleküller üzerine etki ile transkripsiyonu önleyebilmektedirler. Üçüncüsü, STAT sumoyilasyon yapabilmektedirler. SLIM proteinleri STAT1 ve STAT4'ün gen transkripsiyonunu inhibe edebilmektedirler. Hem ubiquitinizasyonu hem de protein degradasyonunu artırıcı faaliyetler içinde oldukları gösterilmiştir.

### ***SOCS***

Jak STAT yolağını indüklenabilir şekilde inhibe ettikleri anlaşılan SOCS ailesi, CIS ve SOCS1-7 olmak üzere sekiz üyeden oluşmaktadır(34). Yapısal olarak tüm moleküllerde N-terminal kısmı, SH2 alanı ve C-terminal bölgesi bulunmaktadır. SOCS ekspresyonu LPS gibi sitokin olmayan agonistlerce de artabilmektedir.

Sitokin sinyalizasyonunun süpresör proteinleri Jak-STAT sinyalizasyonunu birkaç farklı mekanizma ile inhibe edebilmektedir. İlki, STAT veya Jak'ların reseptör kompleksine bağlanmak için yarışa girmek şeklindedir. CIS ve SOCS2 nin aktive reseptör fosforile tirozin bölgelerine tutunmalarıyla STAT5'in bu bölgeye bağlanmasını engellediği gösterilmiştir. İkincisi, Jak molekülüne direkt bağlanarak aktivitesinin inhibe edilmesidir. SOCS1 ve SOCS3

Jak ların kinaz aktivitesini engelleyebilen inhibitör bölgeye sahip olukları gösterilmiştir. Üçüncüsü, Jak proteinlerinin ubiquitinasyonu ve degradasyonudur. Ubiquitin-proteasome yolunda bir proteinin yıkılması üzerine, substratın ubiquitin molekülüne kovalan bağla bağlanması ve 26S proteozom ile ATP bağımlı proteolizisin gerçekleşmesi olmak üzere birbirini takip eden iki olay gerçekleşir.

## 2.9 SİTOKİNLER, STAT'LAR VE KARACİĞER HASTALIKLARI

Çeşitli sitokin ve büyüme faktörleri ile aktive olan STAT'ların karaciğerde birçok fonksiyonu bulunmaktadır(35).

### STAT1:

STAT1, karaciğerde başlıca IFN- $\alpha/\beta$  ve IFN- $\gamma$  sitokinleri ile aktivasyon kazanır. STAT1'in ortadan kaldırıldığı hayvan modellerinde STAT1'in karaciğerde viruslara karşı savunmada, inflamasyon ve zedelenme oluşumunda önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir(35).

### *IFN- $\alpha/\beta$*

IFN- $\alpha$  viral hepatitlerin tedavisinde (HCV) son 10 yıldır ilk seçenek olmaya devam etmektedir. Bundan dolayı IFN- $\alpha$ 'nın tetiklediği hücre içi sinyalizasyonu ve antiviral gen etkinliği çeşitli araştırmalara konu olmuştur. IFN- $\alpha/\beta$ 'nun JAK1 ve Tyk2'ye bağlandıktan sonra IFNAR1 fosforile edilir. Bu da STAT1 ve STAT2 fosforilasyonuna aracı olur. Homodimer veya heterodimer forma geçtikten sonra nükleusa transloke olup antiviral protein, tumor süpresörler, proapoptatik proteinler üreten birçok hedef genin transkripsiyonuna yol açarlar.

Viral hepatitlerde IFN- $\alpha/\beta$  tedavisinin antiviral etkisinin JAK-STAT sinyalizasyon yolağı aracılığıyla meydana geldiğine inanılmaktadır. İnsan hepatositleri çok miktarda IFN- $\alpha/\beta$  reseptörü (IFNAR)1 ile fonksiyonel IFNAR2c eksprese etmektedir ve IFN- $\alpha$

stimülasyonuna da iyi yanıt vermektedir. IFN- $\alpha/\beta$  insan hepatositlerinde ve insan hepatoma hücrelerinde STAT1, STAT2, STAT3 ve STAT5 proteinlerinin aktivasyonunu indükler. IFN- $\alpha$ , yaklaşık olarak 50 geni ekspresyonunda iki kat artışa, yaklaşık 10 genin ekspresyonunda da %50 azalmaya yol açar. Bu genler arasında antiviral ve proapoptotik/tümör süpresör genler yer alır. Antiviral ve antitümör aktivitenin gelişiminde STAT1'in rolü STAT1'in ortadan kaldırıldığı hayvan modelinde gösterilmiştir. Hepatit C virusü ile enfekte hücre dizisinde IFN- $\alpha$ 'ya bağlı gelişen antiviral aktivitenin STAT3 ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir.

IFN- $\alpha/\beta$ , viral hepatitlerin tedavisinde ilk tercih edilmesine karşın hastaların %60-80'den fazlasında tedaviye yanıt yetersizdir. Bu cevapsızlıkta IFN- $\alpha/\beta$  ile aktive olan sinyalizasyonun çeşitli viral proteinlerle inhibe edilmesinin ve konağa ait bazı faktörler rolü oynamaktadır. İnhibisyonda rol alan viral proteinler arasında HCV E2 protein, HCV kor protein ve HCV yapısal olmayan 5A'nın olduğu düşünülmektedir. Konağa ait faktörler arasında bulunan alkol kullanımı ise TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-10'nun IFN- $\alpha/\beta$  ile aktive olan STAT1'in inhibe edilmesinde rol alarak interfeon tedavisine cevapsızlığa katkıda bulunur.

### ***IFN- $\gamma$***

IFN- $\gamma$  antiviral, antiproliferatif, proapoptotik, proinflamatuvar ve immünoreglatuvar gibi bir çok etkisi olan bir sitokin olup etkisini JAK-STAT sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirir. IFN- $\gamma$ 'nın IFNGR1'e bağlanması sonucunda IFNGR1 ve 2 dimerize olur ve bunu takiben JAK1 ve 2 gibi reseptöre bağlı kinazlarda aktivasyon meydana gelir. Reseptör-kinaz kompleksi, başta antiviral, proapoptotik, antiproliferatif olmak üzere birçok genin ekspresyonunu sağlayan STAT1'i aktive eder. STAT1 yok edildiği hayvan modellerinde IFN- $\gamma$  sinyalizasyon sisteminin bozulduğu, viral ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı doğal immün cevabın ortadan kalktığı gözlenmiştir. Çok çeşitli karaciğer zedelenme modellerinde aktive olan STAT1'in IFN- $\gamma$  ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. STAT1 geninin hasarlanması ile de



hepatik zedelenmenin ortadan kalktığı izlenmiştir. Kronik C hepatitli hastaların karaciğer dokularında yüksek seviyede IFN- $\gamma$  mRNA ve STAT1 proteinine rastlanması patogenezdeki rolünün önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

### **STAT2:**

STAT2 sadece tip I IFN'larla (IFN- $\alpha/\beta$ ) ve IFN- $\lambda$  ile aktive olur. STAT2'nin ortadan kaldırıldığı hayvan modellerinde viruslarla enfekte olma oranlarında artış gözlenmekte, tip I IFN otokrin/parakrin döngü kaybı olmaktadır(35, 36). IFN- $\alpha$  tedavisiyle hepatositlerde STAT2 aktivasyonunda belirgin artış görülmesi, viral hepatitlerde IFN- $\alpha$ 'nın antiviral etkisinde STAT2 aktivasyonun çok önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Alkole bağlı gelişen karaciğer hastalığında meydana gelen STAT2 ekspresyonunda azalmanın, IFN- $\alpha$  cevapsızlığına katkıda bulunan en önemli faktör olduğu iddia edilmektedir(35).

### **STAT3:**

STAT3 başlıca, karaciğerdeki akut faz yanıtında, hepatik zedelenmeden korunmada, karaciğer rejenerasyonun artmasında, glikoz hemostazında ve lipit metabolizmasında rol alan IL-6 ve IL-22 sitokinleri ile aktive edilir. Bunun dışında IL-10, EGF, hepatit viral proteinler ile de aktive olabilir(35, 36).

#### ***IL-6 ve ilişkili sitokinler***

IL-6, LİF, CNTF, OSM, kardiotrofin-1 ve IL-1 olmak üzere IL-6 ailesine ait olduğu bilinen 6 sitokin bulunmaktadır(35). İnsan hepatositlerinde yüksek miktarda IL-6R, LIFR, CNTRF, OSMR, IL-11R ve kardiotrofin-1R eksprese edilmektedir. IL-6'nın karaciğere olan etkisi bir çok araştırmanın konusu olmakla birlikte IL-6 ile ilişkili sitokinlerin etkileri üzerine yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlı sayıdadır.

#### ***IL-6***

IL-6, karaciğerde akut faz proteinlerinin üretilmesi için hepatositleri uyaran bir sitokindir. IL-6'nın ortadan kaldırıldığı hayvan modellerinde bu molekülün karaciğer rejenerasyonunda veya karaciğer hasarından korunmada rol aldığı gösterilmiştir. IL-6'nın eksik olduğu hayvan modelinde çeşitli zedeleyici etkenlere karşı artmış duyarlılık hali gözlenmiştir. D-galaktozamine bağlı akut karaciğer yetmezliği oluşturulan hayvan modelinde IL-6 uygulanarak nekroz artışının engellendiği, rejenerasyonun indüklendiği ve yaşam süresinde belirgin uzama olduğu gözlenmiştir. Yağlı karaciğer hastalıklarında da invitro ve invivo IL-6 uygulamalarıyla olumlu etkiler saptanmıştır. Sonuç olarak IL-6'nın karaciğer üzerine koruyucu etkiye sahiptir.

IL-6'nın karaciğerdeki etkisi hepatosit yüzeyinde çok miktarda bulunan IL-6R1 ve gp130'la olan etkileşimine bağlıdır. Bu etkileşim JAK1, JAK2 ve Tyr2 kinazlar aktive olur. Bu reseptör kinaz kompleksi sitoplazmik STAT3 transkripsiyon faktörünü aktive eder ve bunu takiben STAT3 de çeşitli genlerin aktivasyonunu sağlar. Yapılan araştırmalarda IL-6 tedavisi sonucunda STAT3'ün aktive olduğu gösterilmiştir. STAT3 gen bozukluğunda hepatik rejenerasyonun aksadığı ve glukojenik genler üzerinden insülin ortaya çıktığı izlenmiştir. Diyabetik ratlarda STAT3'ün süregen ve aşırı aktivasyonu sonucunda ise kan şekerinde ve insülin salınımında azalma olduğu ve Fas'a bağlı gelişen hepatitlerde koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. IL-6'nın koruyucu etkilerinden biri de natural killer hücrelerinin inhibisyonuna bağlıdır. Son dönem çalışmalarda IL-6 tedavisi veya STAT3'ün aşırı ve süregen aktivasyonu sonucunda yağlı karaciğer hastalığında azalma olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu da IL6/STAT3'ün karaciğer yağ metabolizmasında rolü olduğunu işaret etmektedir.

### ***IL-6 ile ilişkili sitokinler***

Bu sitokinlerin de karaciğere etkisi vardır. OSM; hepatositte akut faz protein yapımını uyarır, hepatositin gelişimini, maturasyonunu, ve farklılaşmasını indükler, sitokrom 450

ekspresyonunu kontrol eder ve LDL reseptör dansitesini etkiler. OSM reseptörü ortadan kaldırıldığı hayvan çalışmalarından OSM'nin karaciğer rejenerasyonunda ve zedelenmeden korunmada rol aldığına dair bulgular elde edilmiştir.

Lösemi inhibe edici faktör (LİF) çok farklı sistemlere etkisi olan bir sitokindir. STAT1, STAT3, STAT5 ve p42/44 MAP kinaz üzerinden etkisi ortaya çıkmaktadır. Genel kabul gören görüş karaciğer kök hücre çoğalmasından ve farklılaşmasından sorumlu oldukları yönündedir. LİF ayrıca hepatik lipit metabolizmasını stimüle eder ve akut faz protein ekspresyonunu etkiler.

Silier nörotrofik faktör (CNTF) başlıca etkisini nöral doku üzerinde gösterir. Karaciğer de dahil olmak üzere bazı periferik organlarda da reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. Karaciğerdeki etkisini STAT3 üzerinden yaptığına dair bilgiler bulunmaktadır. Akut faz yanıtına yardımcı olduğu ve diabetik parametrelere ve steatoza olumlu etkide bulunduğu bilinmektedir.

Kardiotrofin-1'in hepatositlerde akut faz protein gen ekspresyonunu artırdığı ve yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir. Bu etkilerini STAT3, ERK1/2 ve PI3 kinaz/akt üzerinden gerçekleştirmektedir.

IL-11'nin asetaminofen gibi maddelerin neden olduğu karaciğer zedelenmesini önlediği gösterilmiştir. IL-11'in reseptör ile etkileşimi sonrasında STAT3 ve ERK sinyalizasyonunun aktive olduğu saptanmıştır.

IL-22, IL-10 ailesine üye olan bir sitokindir. Bu sitokinin STAT3 ve ERK sinyalizasyon yolağını kullandığı gösterilmiştir. T hücreli hepatitte zedelenmeyi önleyici ve hepatosit yaşam süresini uzatıcı etkileri bulunmaktadır. Anti-apoptotik ve proliferasyona yönelik genler üzerinden bu etkilerini gerçekleştirdiği iddia edilmektedir.

### ***STAT3'ü aktive eden diğer faktörler***

IL-10 ve EGF'in karaciğerde STAT3'ü aktive ettikleri gösterilmiş, ancak bu durumun parankimal hücrelerden ziyade parankim dışı hücrelerde gerçekleştiği düşünülmektedir. IL-10'nun, farklı hepatik zedelenme modellerindeki hasar önleyici etkisi anti-inflamatuvar etkiye bağlanmaktadır(35). Son dönemde çeşitli hepatik viral proteinlerinin de STAT3'ü aktive ettiği gözlenmiştir. Örneğin HCV NS5A ve HBX proteinlerinin reaktif oksijen radikalleri üzerinden STAT3 aktivasyonuna yol açtığı iddia edilmektedir. STAT3'ün akut faz yanıtından sorumlu olduğundan ve tümoral transformasyonda rolü olduğu düşünüldüğünden dolayı, bu molekülün HBV ve HCV'li olgularda görülen akut hepatit ve hepatoselüler karsinoma gelişmesinde etkisi olduğu düşünülmektedir.

### **STAT4**

STAT4'ü başlıca aktive eden sitokin Th1 farklılaşmasına yol açan IL-12'dir(35). STAT4'ün, myeloid hücrelerde, timusta ve testiste eksprese edildiği gösterilmiştir. İskemi/reperfüzyon dahil olmak üzere çeşitli hepatik zedelenme modellerinde de STAT4 aktivasyonu gösterilmiştir. İskemi/reperfüzyon maruziyetinden sonra STAT4 geninin ortadan kaldırıldığı modellerde hepatik zedelenmenin azaldığı izlenmiştir. Fakat bu durum başka araştırmalarda doğrulanmamıştır. IL-12, çeşitli hepatik zedelenme modellerinde, zedelenmenin gelişiminden ve artmasından sorumlu tutulmuşsa da bu etkilerinin, STAT4 üzerinden olduğu ispatlanamamıştır.

### **STAT5**

Birçok sitokin tarafından aktive edilebilen STAT5'in karaciğerdeki aktivasyonunu başlıca büyüme hormonu gerçekleştirir(35). Sitokrom P450, glutatyon S-transferaz, sulfotransferaz enzim ve büyüme hormonu reseptörü gibi birçok gen STAT5 ile uyarılır. Bu genler, metabolizma, büyüme ve farklılaşma için gereklidirler. Hayvan modellerinde büyüme

hormonu enjeksiyonunu takiben karaciğerde ERK, STA1, STAT3 ve STAT5 aktivasyonunun olduğu görülmüştür. Reseptör ile ilişkili JAK2 kinaz aktivasyonunu takiben STAT1, STAT3, STAT5, insülin reseptör substrat 1, SHC, mitojen aktive protein kinaz gibi birçok intraselüler protein fosforile edilir.

### **STAT6**

Başlıca IL-12, IL-4 ve IL-13 ile aktive olan STAT6 Th2'nin differansiasyonunda önemli bir yere sahiptir(35). Con A'ya bağlı hepatitte STAT6 aktivasyonunun IL-4 üzerinden olduğu gösterilmiştir. IL-4/STAT6'nın etkisi farklı hepatit modellerinde izlenmiştir. IL-4/STAT6, T hücreli hepatitte hepatositte ve sinuzoidal endotelial hücrede eotaksinlerin ekspresyonunu ve IL-5 ekspresyonunu indükleyerek ve sonrasında nötrofil ve eozinofil infiltrasyonunu artırarak etki gösterirler. Buna karşı IL-4/STAT6'nın iskemi/reperfüzyona bağlı gelişen hepatik zedelenmede koruyucu etkiye sahip oldukları da saptanmıştır. IL-4 ve IL-13 enjeksiyonu sonrasında STAT6 aktive olmakta ve hepatik iskemi/reperfüzyon zedelenmesi azalmaktadır. STAT6'nın ortadan kaldırıldığı hayvan modellerinde endotoksine bağlı hepatik zedelenmeye duyarlılığın arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular karaciğerde meydana getirilen zedelenme modeline göre STAT6 aktivasyonunun yararlı olabileceği gibi zararlı etkilere de yol açabileceğini düşündürmektedir.

### 3. HASTALAR VE YÖNTEM

#### *Hastalar:*

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bölümüne 2005-2007 yılları arasında başvuran karaciğer biyopsisi endikasyonu bulunan kronik B hepatitli olgular çalışmaya alındı. Karaciğer biyopsisi endikasyonları arasında kronik HBV enfeksiyonlu HBeAg pozitif olanlarda HBV DNA $\geq 10^5$  kopya/ml olması, HBeAg'i negatiflerde HBV DNA $\geq 10^4$  kopya/ml olması, ALT değeri normalin üzerinde olması veya 35-40 yaş grubunda HBV DNA titresi yüksek ama ALT değerinin normal sınırlarda olması vardı. Hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri arasında kronik HBV enfeksiyonunun olması dışında histopatolojik olarak kronik hepatitle uyumlu olması ve STAT protein boyamaları için uygun miktarda karaciğer doku örneklerinin bulunması vardı. Çalışma dışı bırakılma kriterleri; kayıtlarla tespit edilmiş neoplazm, akut karaciğer yetmezliği, 20gr üzerinde alkol tüketimi, sepsis, hepatotoksite şüphesi, bilinen genetik karaciğer hastalığı, alkole bağlı olmayan steatohepatit, transplantasyon vakaları, diğer karaciğer hastalıkları, kronik böbrek yetmezliği, nutrisyonel yetersizlik haliydi.

Hastaların karaciğer biyopsisi öncesi demografik ve laboratuvar verileri kaydedildi. HBeAg, HBV DNA, ALT değerleri not edildi. Histopatolojik değerlendirme İshak skorlamasına göre Patoloji bölümünde yapıldı. Benzer şekilde istirahat STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5B ve STAT6 immünohistokimyasal boyamaları Patoloji BD.'da gerçekleştirildi. Sonuçlar, STAT proteinlerinin eksprese olup olmamasına göre negatif ve pozitif olarak kaydedildi. Pozitiflik saptanması durumunda yüzdesel oranlar belirlendi.

#### *STAT proteinlerinin immünohistokimyasal boyanması:*

Formalin ile tespit edilen dokulara ait parafin bloklarından 4 mikrometre kalınlıkta kesitler polilizinli lamlara alındı. STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5B ve STAT6

ekspresyonunu belirlemek için streptavidin-biyotin üçlü indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapıldı. Bu amaçla, Stat-1 (Rabbit monoklonal IgG), Stat-2 (Rabbit IgG), Stat-3 (Rabbit IgG), Stat-4 (Rabbit IgG), Stat-5b (Rabbit poliklonal), Stat-6 (Rabbit mAb) kullanıldı. Kullanılan biyotinlenmiş bağlayıcı (sekonder) antikor, streptavidin-biyotin kompleksi ve kromojen olarak kullanılan 3,3'-diaminobenzidin (DAB) ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklinde idi. Stat-1, Stat-2, Stat-3, Stat-4, Stat-5b, Stat-6 ve DR-5 antikorunun pozitif kontrolü olarak prostat dokusu kullanıldı.

Hazırlanan parafin doku kesitleri Stat-1, Stat-2, Stat-3, Stat-4, Stat-5b, Stat-6 antikorları ile aşağıdaki prosedüre göre boyandı:

1. Polilizinli lam üzerine alınan 4 mikronluk kesitler 56°C'lik etüvde gece boyunca deparafinize edildi.
2. Kesitler ksilolde 30 dakika bekletildi.
3. Fiksasyon için %96'lık alkolde 15 dakika tutuldu.
4. Endojen peroksidazı bloke etmek için oda sıcaklığında %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika bekletildi. Distile suda yıkandı.
5. Antijen retrieval için Stat-1 antikoruna boyanacak kesitler mikrodalga fırında EDTA tampon ile, pH 8'de, Stat-3 antikoruna boyanacak kesitler tripsin enziminde 37°C'de 15 dakika, Stat-2, Stat-4, Stat-5b, Stat-6, DR-5 boyanacak kesitler ise mikrodalga fırında sitrat tamponu ile, pH 6'da 20 dakika bekletildi.
6. Kesitler distile su ile, ardından PBS ile yıkandı.
7. Protein bloklama için non-immün protein bloklama serumunda 20 dakika tutuldu ve ardından kurulandı.
8. Primer antikor olan Stat-1 (Epitomics), Stat-2 (Biovision), Stat-3 (Biovision), Stat-4 (Biovision), Stat-5b (AnaSpec), Stat-6 (Epitomics) antikorları lam üzerindeki doku

- kesitlerini kapatacak şekilde damlatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Kesitler PBS ile yıkandı.
9. Bağlayıcı (sekonder) antikor (Multi-species ultra streptavidin detection system-HRP; Zymed, Massachusetts, USA) ile oda sıcaklığında 20 dakika süre ile inkübasyon yapıldı. PBS ile yıkandı.
  10. Streptavidin-biyotin kompleksi uygulanarak 20 dakika bekletildi (Zymed). PBS ile yıkandı.
  11. Renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla DAB (3,3'-diaminobenzidin; Lab-Vision, Neomarkers, USA) ile 10 dakika süre ile inkübasyon yapıldı.
  12. Çeşme suyu ile yıkandı.
  13. Harri's hematoksilin ile zemin boyaması yapıldı. Çeşme suyu ile yıkandı.
  14. 2 dakika süreyle alkolde, 2 dakika süreyle ksilolde tutuldu.
  15. Doku kesitleri entellan kullanılarak kapatıldı.

***Boyanmanın değerlendirilmesi:***

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde tüm antikorlar için sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edildi. Pozitif boyanma gösteren hepatositlerin, biyopsideki tüm karaciğer dokusuna oranı belirlendi. Hücrelerin boyanma oranları yüzde değerler verilerek oranlandı.

***İstatistiksel değerlendirme:***

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi Pearson Chi-Square, Fisher's Exact Test ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak gerçekleştirildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1 Genel Bilgiler

Çalışmada, toplam 35 olgu değerlendirildi. Ortalama yaş 37.5 (aralık: 17-60 yaş) olarak saptanmıştır. Olguların %28.6'sının 30 yaş ve daha altı yaş grubunda, %31.4'ünün 31-40 yaş grubunda ve %40'ının 41 ve üstü yaş grubunda olduğu belirlenmiştir. Olguların 21'i (%60) erkek, 14'i (%40) ise kadın hastalardan oluşmuştur.

Olguların 7(%20)'sinde HBeAg pozitifliği, 28(%80)'sinde ise negatifliği saptanmıştır. HBV DNA ortanca değeri 1000000 kopya/ml ve aralığı 500-800.000.000 kopya/ml olarak, ALT ortanca değeri 70ml/L ve aralığı ise 17-947ml/L olarak bulunmuştur. ALT'nin referans değerlerine göre olgular ALT değeri normal (40 ve altı ) ve ALT değeri yüksek (41 ve üzeri) olarak iki gruba ayrıldığında sırasıyla %33.3 ve %66.7'lik bir dağılım gözlenmiştir. Olgular nekroinflamatuvar aktiviteyi gösteren İshak skoruna göre 1-4, 5-8, 9-12 ve 13-16 şeklinde dört gruba ayrılmıştır. Gruplar, minimal, hafif, orta ve şiddetli olarak isimlendirilerek grup 1, 2, 3 ve 4 olarak numaralandırılmıştır. Buna göre olguların %28.6'sı grup 1'de, %31.4'ü grup 2'de ve %40'ı grup 3'de yer almıştır. Grup 4'e giren olgu saptanmamıştır. İshak skorlamasına göre fibrozis evreleri 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 olarak tanımlanmıştır. Olguların %5.7'si evre 1'de, %31.4'ü evre 2'de, %45.7'si evre 3'de, %11.4' evre 4'de, %2.9'u evre 5'de ve %2.9'u evre 6'da yer almıştır. Evre 1 ve 2 erken evre (%37.1) ile evre 3, 4, 5 ve 6 ise orta-ileri evre (%62.9) olarak gruplandırılmıştır.

### 4.2 STAT Karakteristikleri

İstirahat STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5B ve STAT6 ekspresyon sıklıkları sırasıyla %57, %23, %46, %66, %35 ve %86 olarak bulunmuştur. İstirahat STAT1 ve STAT2'nin birlikte negatif olduğu olguların oranı %29, her ikisinin birlikte ekspresyonunun

görüldüğü olguların oranı %9 ve ikisinden birinin eksprese olduğu olguların oranı ise %62 olarak saptanmıştır. İstirahat STAT protein ekspresyon şekilleri Tablo 2’de sunulmuştur.

Tablo 2. İstirahat STAT proteinlerinin ekspresyon profilleri

	Yaş/ Cinsiyet	HBeAg	STAT1	STAT2	STAT3	STAT4	STAT5B	STAT6	ALT (ml/L)
1	37/K	-	+	-	-	+	-	+	200
2	33/K	-	+	-	-	+	+	-	18
3	22/K	-	+	-	+	+	+	+	58
4	49/K	-	+	-	+	+	-	+	14
5	24/E	+	-	-	+	+	-	+	189
6	30/K	-	+	-	+	+	-	+	14
7	25/E	-	-	-	+	+	-	+	107
8	33/E	+	+	-	-	+	-	+	94
9	45/E	-	+	-	+	+	-	+	32
10	46/E	-	-	-	-	-	-	+	40
11	31/E	-	-	-	-	+	+	+	267
12	39/E	-	-	-	-	-	-	+	71
13	33/E	+	+	-	-	+	+	-	23
14	55/K	-	+	-	-	-	-	+	61
15	56/K	-	-	-	-	-	-	+	93
16	26/E	+	+	-	-	+	+	+	46
17	17/E	-	+	-	-	-	+	+	50
18	50/E	-	+	-	+	+	-	+	40
19	30/E	-	+	-	-	+	+	-	22
20	23/E	+	-	-	-	-	+	+	947
21	41/E	-	+	-	-	-	-	+	84
22	50/K	-	+	-	-	-	-	+	65
23	33/K	-	-	+	+	+	-	+	24
24	22/K	+	+	-	-	-	-	+	70
25	38/E	-	-	-	-	+	+	+	53
26	60/K	-	-	+	+	+	+	-	30
27	26/E	+	+	+	+	-	-	+	140
28	41/E	-	+	+	+	+	-	+	109
29	36/K	-	-	-	-	+	-	+	92
30	31/E	-	-	+	+	+	-	+	54
31	46/E	-	-	+	+	+	+	+	413
32	44/E	-	-	+	-	-	-	+	275
33	41/K	-	+	+	+	+	-	-	169
34	40/K	-	+	-	-	+	-	+	176
35	47/E	-	-	-	+	+	-	+	168

### 4.3 STAT Proteinleri ile Yaş ve Cinsiyet İlişkisi

#### STAT Proteinleri ve Yaş

STAT1-Yaş: Yaş grupları arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır(p=0,49).

STAT2-Yaş: Yaş grupları arasında istirahat STAT2 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,30$ ).

STAT3-Yaş: Yaş grupları arasında istirahat STAT3 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,12$ ).

STAT4-Yaş: Yaş grupları arasında istirahat STAT4 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,13$ ).

STAT5B-Yaş: Yaş grupları arasında istirahat STAT5B ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,25$ ).

STAT6-Yaş: Yaş grupları arasında istirahat STAT6 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,87$ ).

STAT1 ve STAT2 Birlikte-Yaş: Yaş grupları arasında istirahat STAT1 ve STAT2'den en az birinde veya birlikte ekspresyon pozitifliği gösterenlerle birlikte negatif olanlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,91$ ).

### **STAT Proteinleri-Cinsiyet**

STAT1-Cinsiyet: Kadın ve erkek grupları arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,09$ ).

STAT2-Cinsiyet: Kadın ve erkek grupları arasında istirahat STAT2 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,70$ ).

STAT3-Cinsiyet: Kadın ve erkek grupları arasında istirahat STAT3 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=1,00$ ).

STAT4-Cinsiyet: Kadın ve erkek grupları arasında istirahat STAT4 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=1,00$ ).

STAT5B-Cinsiyet: Kadın ve erkek grupları arasında istirahat STAT5B ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,28$ ).

STAT6-Cinsiyet: Kadın ve erkek grupları arasında istirahat STAT6 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,63$ ).

STAT1 ve STAT2 Birlikte-Cinsiyet: Kadın ve erkek grupları arasında istirahat STAT1 ve STAT2den en az birinde veya birlikte ekspresyon pozitifliği gösterenlerle birlikte negatif olanlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,07$ ).

#### **4.4 STAT-Determinant İlişkileri**

##### **STAT Proteinleri-HBeAg**

STAT1-HBeAg: HBeAg pozitif ile negatif gruplar arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,40$ ).

STAT2-HBeAg: HBeAg pozitif ile negatif gruplar arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,65$ ).

STAT3-HBeAg: HBeAg pozitif ile negatif gruplar arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=1,00$ ).

STAT4-HBeAg: HBeAg pozitif ile negatif gruplar arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,35$ ).

STAT5-HBeAg: HBeAg pozitif ile negatif gruplar arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,67$ ).

STAT6-HBeAg: HBeAg pozitif ile negatif gruplar arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=1,00$ ).

STAT1 ve STAT2 Birlikte-HBeAg: HBeAg pozitif ile negatif gruplar arasında istirahat STAT1 ve STAT2den en az birinde veya birlikte ekspresyon pozitifliği gösterenlerle birlikte negatif olanlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=1,00$ ).

#### **STAT Proteinleri- ALT**

STAT1-ALT: ALT normal ile yüksek değerler gösteren gruplar arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,70$ ).

STAT2-ALT: ALT normal ile yüksek değerler gösteren gruplar arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,35$ ).

STAT3-ALT: ALT normal ile yüksek değerler gösteren gruplar arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,43$ ).

STAT4-ALT: ALT normal olan grupta istirahat STAT4 ekspresyon pozitifliği %100 iken yüksek olan grupta %57,7'dir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır(p=0,034).

STAT5B-ALT: ALT normal ile yüksek değerler gösteren gruplar arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır(p=0,39).

STAT6-ALT: ALT normal olan grupta istirahat STAT6 ekspresyon pozitifliği %50 iken yüksek olan grupta %96.3'dir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır(p=0,006).

STAT1 ve STAT2 Birlikte-ALT: ALT normal ile yüksek değerler gösteren gruplar arasında istirahat STAT1 ve STAT2den en az birinde veya birlikte ekspresyon pozitifliği gösterenlerle birlikte negatif olanlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır(p=0,013). ALT normal grupta STAT1 ve STAT2 birlikte negatiflik %9 iken, istirahat STAT1 ve STAT2den en az birinde veya birlikte ekspresyon pozitifliği %91 sıklıktadır.

#### **STAT Proteinleri-HBV DNA**

STAT1-HBV DNA: İstirahat STAT1 ekspresyonu gösterenlerin, u-STAT1 ekspresyonu saptanmayan gruba kıyasla HBV DNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

STAT2-HBV DNA: İstirahat STAT2 ekspresyonu gösterenlerin, u-STAT2 ekspresyonu saptanmayan gruba kıyasla HBV DNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

STAT3-HBV DNA: İstirahat STAT3ekspresyonu gösterenlerin, u-STAT3 ekspresyonu saptanmayan gruba kıyasla HBV DNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

STAT4-HBV DNA: İstirahat STAT4 ekspresyonu gösterenlerin, u-STAT4 ekspresyonu saptanmayan gruba kıyasla HBV DNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

STAT5B-HBV DNA: İstirahat STAT5B ekspresyonu gösterenlerin, u-STAT5B ekspresyonu saptanmayan gruba kıyasla HBV DNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

STAT6-HBV DNA: İstirahat STAT6 ekspresyonu gösterenlerin, u-STAT6 ekspresyonu saptanmayan gruba kıyasla HBV DNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir.

STAT1 ve STAT2 Birlikte –HBV DNA: İstirahat STAT1 ve STAT2den en az birinde veya birlikte ekspresyon gösterenlerin, u-STAT1 ve u-STAT2 birlikte ekspresyon saptanmayan gruba kıyasla HBV DNA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

#### **STAT Proteinleri-Nekroinflamasyon Aktivitesi (NIA)**

STAT1-NİA: NİA'leri minimal(grup 1), hafif(grup 2) ve orta(grup 3) gruplar arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,55$ ).

STAT2-NİA: NİA'leri minimal, hafif ve orta gruplar arasında istirahat STAT2 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır( $p=0,014$ ). NİA grubu 1 ve 2 olanların STAT2 ekspresyon sıklığı %11,1 iken 3 olanların ekspresyon sıklığı %62,5 olarak saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

STAT3-NİA: NİA'leri minimal, hafif ve orta gruplar arasında istirahat STAT3 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir

farklılık saptanmıştır( $p=0,007$ ). NİA grubu 1, 2 ve 3 olanların istirahat STAT3 ekspresyon negatifliği sırasıyla %16.7, %77.8 ve %5.6 olarak bulunmuştur. NİA 1., 2. ve 3. gruplarda istirahat STAT3 ekspresyon sıklığı ise sırasıyla %37.5, %25 ve %37.5 olarak belirlenmiştir.

STAT4-NİA: NİA'leri minimal, hafif ve orta gruplar arasında istirahat STAT4 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır( $p=0,015$ ). NİA grubu 1., 2. ve 3. olanların istirahat STAT4 ekspresyon negatifliği sırasıyla %0, %81.8 ve %18.2 olarak bulunmuştur. NİA 1., 2. ve 3. gruplarda istirahat STAT4 ekspresyon sıklığı ise sırasıyla %39.1, %34.8 ve %26.1 olarak tespit edilmiştir.

STAT5B-NİA: NİA'leri minimal, hafif ve orta gruplar arasında istirahat STAT5B ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,27$ ).

STAT6-NİA: NİA'leri hafif, orta ve şiddetli gruplar arasında istirahat STAT6 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=1,00$ ).

STAT1 ve STAT2 Birlikte-NİA: NİA'leri minimal, hafif ve orta gruplar arasında istirahat STAT1 ve STAT2'den en az birinde veya birlikte ekspresyon pozitifliği gösterenlerle birlikte negatif olanlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır( $p=0,77$ ).

#### **STAT Proteinleri-Fibrozis Evresi (FE)**

STAT1-FE: Fibrozis evreleri arasında istirahat STAT1 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,73$ ).

STAT2-FE: Fibrozis evreleri arasında istirahat STAT2 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=1,00$ ).



STAT3-FE: Fibrozis evreleri arasında istirahat STAT3 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,15$ ).

STAT4-FE: Fibrozis evreleri arasında istirahat STAT4 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,47$ ).

STAT5B-FE: Fibrozis evreleri arasında istirahat STAT5B ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=1,00$ ).

STAT6-FE: Fibrozis evreleri arasında istirahat STAT6 ekspresyonunun pozitifliği ile negatifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,34$ ).

STAT1 ve STAT2 Birlikte-FE: Fibrozis evreleri arasında istirahat STAT1 ve STAT2den en az birinde veya birlikte ekspresyon pozitifliği gösterenlerle birlikte negatif olanlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır( $p=0,48$ ).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

STAT proteinleri çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin reseptör sonrası nükleer transkripsiyonuna aracı olan proteinlerdir. Bu proteinlerin kronik viral hepatitlerdeki önemi özellikle iki yönüyle vurgulanmaktadır. Birincisi, virusa karşı bağışıklık sisteminin en önemli parçası olan ve bu yönüyle farmakolojik tedavide de yer alan interferonun bu hücre içi ileti sistemini kullanmasıdır. İkincisi ise viral savunmada önemli bir yere sahip olan bu sistemin virus tarafından devre dışı bırakıcı stratejilerle karşı karşıya kaldığının ortaya çıkarılmasıdır.

Bu çalışmanın **betimleyici kısmında** kronik B hepatitli 35 olgunun istirahat STAT profili ortaya konmuştur. Bu profil, tıbbi literatürdeki kronik B hepatitinde çalışılmasıyla, STAT proteinlerinden altısının bir arada değerlendirilmesiyle ve de istirahat kısmının temel alınmasıyla bu konuyla ilgili önemli boşlukları dolduran bir ilk çalışmadır.

Literatürdeki çalışmaların ağırlıklı olarak kronik C hepatitinde ve genellikle hayvan modellerinde veya hücre kültürlerinde yapılmış olduğu görülmektedir(38-41). Bu çalışmalarda, çoğunlukla bir veya birkaç STAT proteini özellikle de bu proteinlerin fosforile formları ele alınmıştır. En kapsamlı olanı da, Larrea ve arkadaşlarınca kronik C hepatitinde STAT1, STAT2 ve STAT3 çalışmasıdır(42). Bizim çalışmamızın kronik B hepatiti üzerine olması ve STAT1-6 proteinlerinin ekspresyonlarının bir arada irdelenmesi ileriki araştırmalar için referans olma ihtimalini güçlendirmektedir.

STAT proteinlerinin eksprese edilip edilmemesinin bir arada belirlenmesi siroz dahil olmak üzere kronik B hepatiti ile ilgili özel durumların betimlenmesi açısından da büyük önem taşımaktadır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde ilk dikkati çeken konu, kronik B hepatitli olgularda STAT proteinlerinin ekspresyonlarının heterojen olmasıdır. Olguların istirahat STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5B ve STAT6 ekspresyonları sırasıyla %57, %23, %43, %66, %35 ve %86 oranında pozitif bulunmuştur. STAT2, STAT3 ve STAT5B

yarıdan az olguda, STAT1, STAT4 ve STAT6'nın ise yarıdan fazla olguda eksprese olduğu izlenmektedir. Bu durum kronik B hepatitli olgularının hücre içi sinyal ileti sistemi açısından heterojen olduğunu düşündürmektedir. Bu da kronik B hepatiti adı altında toplanan süreçte farklı immünolojik mikro çevrelerin oluşturduğu evrelerin gerçekleştiği savının doğmasına sebep olmaktadır. Altı STAT proteininin kombinasyonları dikkate alındığında ise çok miktarda STAT paterninin olası olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu farklı paternlere sebep olabilecek olası etkenler arasında STAT uyarımı yapan ligandlar yani sitokinler bulunmaktadır. Ligand uyarısıyla sadece istirahat STAT proteini fosforile edilmekle kalmamakta aynı zamanda istirahat STAT 1 ve 3'ün miktarlarında da artış gözlenmektedir. Çeşitli sitokinlerin aynı STAT molekülünü kullanması nedeniyle bu çalışmada hangi ligandın bu etkiye yol açtığını belirlemek mümkün olmamıştır. İleride yapılacak çalışmalarda ilgili STAT proteininin ligandının mRNA'sının beraber çalışıldığı bir düzenek bu bilgiyi sağlayabilir.

STAT proteininin regülasyonu bölümünde ve yukardaki metinde bahsedildiği gibi STAT degradasyonlarının varlığı ekspresyon negatifliğine ek katkı sağlayabilmektedir. Bir başka ifadeyle STAT proteini gen düzeyinde eksprese edilse bile ekspresyon sonrasında yıkıma uğraması negatif sonuç elde edilmesine yol açabilmektedir(43). Dolayısıyla STAT proteininin ekspresyonunun saptanmamasını, ilgili sitokin yokluğu ile açıklamak mümkün gözükmemektedir.

Bu profil içerisinde yer alan STAT1, STAT2 ve STAT3'ün güncel paradigmaya göre viruslere karşı gelişen immün yanıtta önemli yeri vardır. İnterferonun rol aldığı hücre içi sinyal iletilerinde STAT1 ve STAT2 bulunmaktadır. STAT3'ün ise antiviral etkinliğinin olduğu STAT3'ün ortadan kaldırıldığı hayvan modellerinde gösterilmiştir. STAT1 ve STAT2'nin birlikte negatif olarak saptandığı olgularda interferonun etkinliğinin olup olmadığı, sorgulanması gereken bir durumdur. Bu çalışmada STAT1 ve STAT2'nin birlikte negatifliği

%29 olguda saptanmıştır. STAT1 ve 2'nin en azından birinin negatif olduğu durum ise %68'dir. STAT1 ve 2'nin birlikte ekspresyonu ise olguların sadece %9'unda belirlenmiştir. İnterferonun yolağında yer alan bu iki STAT proteini birlikte değerlendirilince ekspresyon sıklığının bu denli düşük olması çarpıcı bir veridir. Bu hastaların STAT 1 ve 2 moleküllerinin birlikte negatif veya en azından biri negatif olarak saptanan gruba oranla interferon tedavisine daha fazla cevap verebilir iddiasının doğruluğu bu konuda ileride yapılacak araştırmalar ile açıklık kazandırılabilir.

İnterferonun etkili olduğu gruplar arasında ALT değeri yüksek olarak saptanmaktadır. Bunun ardındaki moleküler nedenler günümüzde bilinmemektedir. Çalışmada ALT değerleri normal olan grup ile yüksek değerler gösteren gruplar arasında istirahat STAT1 ve STAT2'den en az birinde veya birlikte ekspresyon pozitifliği gösterenlerle birlikte negatif olanlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır. ALT değerleri normal olarak saptanan grupta STAT1 ve STAT2'nin birlikte negatifliği %9 iken, istirahat STAT1 ve STAT2'den birinde ya da birlikte ekspresyon pozitifliği %91 sıklıkta saptanmıştır. Elde edilen bu verilere göre kronik B hepatitli ALT'si yüksek olgulardaki interferon etkinliğini interferonun kullandığı hücre içi sinyal ileti sistemine bağlamak mümkün görünmemektedir.

STAT3'ün negatifliği %57 oranında bulunmuştur. Bu olguların %35'ine STAT1 ve 2 negatifliği eşlik etmektedir. STAT1 ve 2 negatif olguların ise %70'inde STAT3 negatifliği saptanmıştır. Tüm seride STAT1, 2 ve 3 'ün birlikte negatifliği %20 oranında gözlenmiştir. Güncel antiviral etkinlikte esas sayılan bu araçların eksprese olmaması bu olgulardaki immün yanıtın nasıl işlediği sorusunu beraberinde getirmektedir.

ALT değerleri 200 IU/L'nin üzerinde olan dört olgu olduğu gözlenmiştir. Bu olguların STAT profilleri incelendiğinde ortak olarak dört olguda da STAT1 ekspresyonu negatif,

STAT6 ekspresyonu ise pozitif bulunmuştur. STAT2 negatifliği ise 3 olguda söz konusudur. İshak fibrozis evresi 6 olan yani sirozla uyumlu tek bir olgu saptanmıştır. Bu olguda STAT1 ve STAT2 ekspresyonu negatif, STAT3, STAT4, STAT5B ve STAT6 ise pozitif olarak bulunmuştur. İshak fibrozis evresi 0 olan ise iki olgu belirlenmiştir. STAT profilleri incelendiğinde STAT1 ve STAT4 ekspresyon pozitifliğinin benzer olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmanın kronik B hepatitindeki önemi önceki çalışmalarla tespit edilmiş parametrelerle istirahat STAT proteinleri arasında **ilişki araştırıldığında** yedi tane istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır: STAT4, STAT6 ve STAT1-STAT2 ile ALT, STAT6 ile HBV DNA, STAT2, STAT3 ve STAT4 ile nekroinflamasyon aktivitesidir.

STAT proteinleri inaktif formda yani fosforile olmamış halde hücre içinde bulunur. Sitokin reseptör bağlantısı ile aktive olan Jaklar ilgili istirahat halde bulunan STAT'ı fosforile ederek aktif hale geçirmektedir. Son dönem çalışmalarda istirahat STAT proteinlerinin etkisiz bir halde yalnızca sitoplazmada aktif hale geçmeyi beklediği ile ilgili bilgilerin yanlış olabileceğini belirten çarpıcı veriler elde edilmiştir. Şimdiye kadar literatürdeki çalışmalarda görülen fosforile STAT proteinlerine ağırlık verilmesi de bu yüzdendir. Bu çalışmada istirahat halinde diye tanımlanan fosforile olmamış STAT proteinleri çalışılmış ve yukarıda bahsedilen parametrelerle istatistiksel olarak anlamlı ilişkilerinin olduğu açığa çıkarılmıştır. Bu veri, fosforile STAT kısmının yanında fosforile olmamış STAT proteinlerinin de kronik B hepatitinde etkin rol aldıklarını göstermektedir.

İstirahat STAT sistemiyle, nekroinflamasyon aktivitenin, ALT değerinin ve HBV DNA parametrelerinin arasında nasıl bir ilişki olduğu şu andaki güncel bilgiye göre belli değildir. Teorik tabanlı düşüncede istirahat STAT proteinlerinin direkt gen etkisi olabileceği akılda tutulmalıdır. Ayrıca kronik B hepatitindeki sitokinlerin rolü muhtelif araştırmalarda

ortaya konmuştur. Her bir STAT proteininin aktive olmasında birçok ligandın etkili olduğu düşünülürse çoklu sitokin etkileşiminin STAT proteinine yansması da söz konusu olabilir.

HBV ile konak arasındaki ilişkinin bir sonucu olarak ortaya çıkan kronik hepatit klinik tablosu esas olarak immünolojik bir tablodur. Virusa karşı gelişen immün yanıtı hem virusa ait hem de konağa ait faktörler belirlemektedir. Dolayısıyla immünolojik yanıt içerisinde yer alan hücre içi sinyal ileti sistemleri de çokca işlemektedir. Bu çalışmada hücre içi sinyalizasyonda yer alan istirahat STAT sisteminin kronik B hepatitinde etkili olduğunu gösterir bulgular elde edilmiştir. Bu sistemin kronik B hepatiti patogeneğinde yer alması demek ileride bu sistemin tedavi hedefleri içerisinde alınabileceği anlamına da gelmektedir. Özellikle immünmodulatuvar amaçlı tedaviler içerisinde bu sistemin konağın lehine kullanılması ileri çalışmalarla araştırılması gereken bir durumdur. Romatoid arthrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde Jak-STAT sistemi hedefli ilaç denemelerinin başlaması da bu konunun gelişime açık olduğunu düşündürmektedir(44).

Bu çalışmamızda kronik B hepatitinde önceden açığa çıkarılmış aktif olan kısmının yanısıra, STAT sisteminin istirahat diye de adlandırılan fosforsuz kısmının da etkin olduğunu göstermektedir. STAT ekspresyon profilinin anlaşılması kronik B hepatitinde patogeneze yönelik ileriki çalışmalara yönlendirici olabilir.

## 6. ÖZET

### KRONİK B HEPATİTLİ OLGULARIN KARACİĞER DOKUSU İSTİRAHAT STAT PROTEİN PROFİLİ

**AMAÇ:** Kronik B hepatitli olguların karaciğer dokusunda istirahat STAT protein profilini belirlemek ve bu proteinlerle ALT değerleri, hepatit B virus DNA seviyeleri ve karaciğer histolojisi arasında ilişkiyi araştırmak.

**TEMEL BİLGİ:** Hepatits B virus ile host etkileşimi esnasında aktive fosforile STAT proteinlerinin bir çok yolağın regülasyonunda görev aldığına dair artan miktarlarda veri ile karşılaşılmaktadır. Yakın zamanda istirahat formu olan fosforsuz STAT(u-STAT) proteinlerinin aktifleşmeyi bekleyen intrasitoplazmik latent araçlar olmaktan öte, doğrudan gen ekspresyonlarında rollerinin olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada kronik B hepatitinde u-STAT profili çalışılmış, klinik önemi olan çeşitli determinantlarla ilişkisi araştırılmıştır.

**HASTALAR VE YÖNTEM:** Önceden tedavi almamış ardışık kronik hepatit B enfeksiyonlu toplam 35 hasta(28 olgu HBeAg negative, 7 olgu HBeAg pozitif) karaciğer biyopsisi yapılarak çalışmaya alındı. Karaciğer dokusunda immünohistokimyasal boyamayla u-STAT1, u-STAT2, u-STAT3, u-STAT4, u-STAT5B ve u-STAT6 ekspresyonu değerlendirildi. STAT ekspresyonlarıyla viral yük, ALT değerleri ve İshak histolojik skorlaması arasında istatistiksel ilişki araştırıldı.

**BULGULAR:** 19'u erkek, 16'sı kadın 35 karaciğer biyopsisinde u-STAT1, u-STAT2, u-STAT3, u-STAT4, u-STAT5B ve u-STAT6 ekspresyonu sırasıyla %57, %23, %46, %66, %35 ve % 86 oranındaydı. u-STAT1 ve u-STAT2 birlikte %29 olguda negatifti. ALT değeri normal ve yüksek gruplar arasında u-STAT4, u-STAT6 ile u-STAT1 ve u-STAT2 birlikteliği

açısından anlamlı farklılık saptandı. HBV DNA titresini ile u-STAT6 arasında da ilişki olduğu bulundu. Ayrıca nekroinflamatuvar aktivite açısından u-STAT2, u-STAT3 ve u-STAT4 ekspresyonlarının anlamlı farklılıklar gösterdiği tespit edildi.

**SONUÇ:** Bu çalışma kronik B hepatitinde aktif olan kısmının yanısıra, STAT sisteminin istirahat kısmının da devrede olduğunu gösteren bir ilk çalışmadır. STAT ekspresyon profilinin anlaşılması kronik B hepatitinde patogeneze yönelik ileriki çalışmalara yön verebilir, Jak-STAT sistemi hedefli tedavi uygulamalarında yararlı olabilir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Scheinecker C, Redlich K, Smolen JS. Cytokines as therapeutic targets: advances and limitations. *Immunity* 2008;28(4):440-4.
2. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 2008;28(4):477-87.
3. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007;282(28):20059-63.
4. Igaz P, Tóth S, Falus A. Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice. *Inflamm Res* 2001;50(9):435-41.
5. Balsano C, Alisi A. Viral hepatitis B: established and emerging therapies. *Curr Med Chem* 2008;15(9):930-9.
6. Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int* 2006;26(9):1029-39.
7. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, Stark GR. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6(12):975-90.
8. Vierling JM. The immunology of hepatitis B. *Clin Liver Dis* 2007;11(4):727-59.
9. Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis* 2007;11(4):685-706.
10. Hollinger FB, Lau DT. Hepatitis B: the pathway to recovery through treatment. *Gastroenterol Clin North Am.* 2006; 35(2):425-61.
11. Missiha SB, Ostrowski M, Heathcote EJ. Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors. *Gastroenterology* 2008;134(6):1699-714.

12. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006;1:23-61.
13. Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res* 2007;127(2):164-76.
14. Loo YM, Gale M Jr. Viral regulation and evasion of the host response. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;316:295-313.
15. Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85(1):16-23.
16. Visvanathan K, Lewin SR. Immunopathogenesis: role of innate and adaptive immune responses. *Semin Liver Dis* 2006;26(2):104-15.
17. Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of viral infections. *Curr Opin Immunol* 2005;17(5):510-6.
18. Herzer K, Sprinzl MF, Galle PR. Hepatitis viruses: live and let die. *Liver Int* 2007;27(3):293-301.
19. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 1995;17(2-3):261-81.
20. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60.
21. Zardi EM, Vespasiani Gentilucci U, Picardi A, Ambrosino G, Fazio VM, Dobrina A, Afeltra A. Iloprost: an adjunctive approach to chronic viral hepatitis treatment. *Med Hypotheses*. 2005;64(1):46-52.
22. Sun QL, Ran W. Review of cytokine profiles in patients with hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2004 Jun 15;10(12):1709-15.

23. Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 2007;178(5):2623-9.
24. O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol* 2007;44(10):2497-506.
25. Lim CP, Cao X. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst* 2006;2(11):536-50.
26. Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem Pharmacol*. 2006 Nov 30;72(11):1538-46
27. Hendry L, John S. Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *Eur J Biochem* 2004;271(23-24):4613-20.
28. O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol* 2007;44(10):2497-506.
29. Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect* 2005;18(4):243-9.
30. Reich NC. STAT dynamics. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18(5-6):511-8.
31. Yang J, Stark GR. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res* 2008;18(4):443-51.
32. Khawaja A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. *Br J Haematol*. 2006 Aug;134(4):366-84.
33. Palvimo JJ. PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans* 2007;35(Pt 6):1405-8.

34. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2007;7(6):454-65.
35. Gao B. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol* 2005;2(2):92-100.
36. Pfitzner E, Kliem S, Baus D, Litterst CM. The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des.* 2004;10(23):2839-50.
37. Terui K, Ozaki M. The role of STAT3 in liver regeneration. *Drugs Today* . 2005 Jul;41(7):461-9.
38. Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everson GT, Lok AS, Morgan TR, Bonkovsky HL, Lee WM, Dienstag JL, Ghany MG, Goodman ZD, Everhart JE. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. *Gastroenterology.* 2004 Apr;126(4):1015-23.
39. Blindenbacher A, Duong FH, Hunziker L, Stutvoet ST, Wang X, Terracciano L, Moradpour D, Blum HE, Alonzi T, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits interferon alpha signaling in the liver of transgenic mice. *Gastroenterology.* 2003 May;124(5):1465-75.
40. Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. *J Virol.* 1999 Oct;73(10):8469-75.
41. Luquin E, Larrea E, Civeira MP, Prieto J, Aldabe R. HCV structural proteins interfere with interferon-alpha Jak/STAT signalling pathway. *Antiviral Res.* 2007 Nov;76(2):194-7.
42. Larrea E, Aldabe R, Molano E, Fernandez-Rodriguez CM, Ametzazurra A, Civeira MP, Prieto J. Altered expression and activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) in hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro studies. *Gut.* 2006 Aug;55(8):1188-96.

43. Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Schmidt EV, Chung RT. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4):1034-41.
44. de Prati AC, Ciampa AR, Cavalieri E, Zaffini R, Darra E, Menegazzi M, Suzuki H, Mariotto S. STAT1 as a new molecular target of anti-inflammatory treatment. *Curr Med Chem*. 2005;12(16):1819-28.
45. Klampfer L. Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006 Mar;6(2):107-21.