

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI

**KRONİK HEPATİT C HASTALARINDA KEMOKİN RESEPTÖR 5
(CCR5) GEN POLİMORFİZMİNİN VE KARACİĞER
EKSPRESYONUNUN KARACİĞER HİSTOPATOLOJİK BULGULAR
ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr.Abdulkerim YILMAZ
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

SİVAS 2009

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI

KRONİK HEPATİT C HASTALARINDA KEMOKİN RESEPTÖR 5
(CCR5) GEN POLİMORFİZMİNİN VE KARACİĞER
EKSPRESYONUNUN KARACİĞER HİSTOPATOLOJİK BULGULAR
ÜZERİNE ETKİSİ

Dr.Abdulkerim YILMAZ
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Hakan ALAGÖZLÜ

SİVAS 2009

ÖZET

Hepatit C virüsü, siroz ve/veya hepatoselüler karsinoma ilerleyebilen kronik karaciğer hastalığının önemli bir nedenidir. İntrahepatik inflamasyon ve karaciğer hücre hasarı kronik HCV enfeksiyonunun belirleyici özellikleridir. Lökositleri inflamatuvar bölgelere çeken kemotaktik sitokinler olan kemokinler intrahepatik inflamasyon gelişiminde önemli rolleri vardır.

CCR532bpdel, CCR5 kemokin reseptörünün delesyon mutasyonudur. Bu mutasyon sonucunda dokuda ve periferik hücrelerde CCR5'in ekspresyonunda önemli azalma görülmektedir. Yakın zamandaki çalışmalarda CCR5 heterozigot mutasyonundan türetilmiş CD3 pozitif T hücreleri CCR5'in ekspresyonunu ve ligandlara cevabını azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında yapılan çalışmalarda CCR5 mutasyonu ve ekspresyonun karaciğer inflamasyonunun modülasyonunda rolü olabileceği bildirilmiştir.

Bu çalışmada; kronik HCV'li hastalarda CCR5 mutasyon sıklığının belirlenmesi; CCR5 mutasyonu ve karaciğer dokusundaki ekspresyonu ile karaciğer histopatolojik bulguları arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı. CCR5 mutasyonu Multipleks PCR analiz ürünleri StripAssay Revers Hibridizasyon tekniği ile genotiplendirildi. Doku ekspresyonu immünohistokimyasal yöntemle belirlendi.

Hasta grubunda yaş ortalamaları 54.3 ± 10.5 olan 25 erkek (%43.1) ve 33 kadın (%56.9) yer aldı. Kontrol grubunda yaş ortalamaları 58.82 ± 11.6 olan 38 erkek (%65.5) ve 20 bayan (%34.5) olmak üzere toplam 58 hasta yer aldı. Her iki grup mutasyon açısından karşılaştırıldığında hasta grubunda 5 hastada (%8.6) CCR5 heterozigot mutasyon saptanırken, kontrol grubunda 1 kişide (%1.7) mutasyon saptandı; iki grup arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p=0.206$).

Hasta grubu mutasyonu olan ve olmayan iki grup şeklinde ayrıldı. Mutasyon saptanan hasta grubunda viral yük $6.4 \times 10^6 \pm 2.9 \times 10^5$ IU/ml şeklindeyken; mutasyon olmayan hasta grubunda $2.8 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^5$ IU/ml idi. İki grup arasında viral yük mutasyonlu hasta lehine istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksekti ($p=0,037$).

Mutasyon saptanan hasta grubunda HAİ (4.0 ± 1.0), saptanmayan hasta grubuna (5.7 ± 1.7) göre anlamlı derecede düşük tespit edildi ($p=0.022$). ALT düzeyleri ile mutasyon arasındaki ilişki incelendiğinde mutasyonlu grupta daha düşük değerler tespit edilirken (55.2 ± 32.4 ; 65.6 ± 38.5) aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p=0.582$).

Mutasyonun fibrozis düzeylerine etkisi incelendiğinde; mutasyon grubunda

1.6±1.3 şeklindeyken, mutasyon olmayan grupta 2.6±1.8 olarak tespit edildi. Fibrozis değeri mutasyonlu grupta daha düşüktü, ancak aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi (p=0.352).

Çalışmaya dahil edilen hastaların karaciğer biyopsi materyallerinde yapılan immünohistokimyasal incelemede; 15'nde (%30) intrahepatik CCR5 ekspresyonu görüldü. Hastaların 30'nda (%70) ekspresyon izlenemedi. 8 hastada teknik nedenlerle inceleme yapılamadı.

Ekspresyon izlenen hasta grubunda HAI 6.1±2.3 şeklindeyken, izlenmeyen grupta 4.9±1.3 idi. Aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlıydı (p=0.034). Fibrozis düzeyleri ekspresyon izlenen grupta 2.1±2.1 şeklindeyken, izlenemeyen grupta 1.9±1.5 idi. Ekspresyon izlenemeyen grupta fibrozis düzeyi daha düşük idi, fakat aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi (p=0.625).

Hepatit C'li hastalardan mutasyon saptanmayan 45 hastanın 15'nde doku ekspresyonu izlenirken; mutasyon saptanan 5 hastanın hiç birinde ekspresyon yoktu. Aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi.(p=0.305).

Sonuç olarak; CCR5 polimorfizmi HCV'li hastalarda sağlıklı popülasyondan daha yüksektir. Bu mutasyon karaciğer inflamasyonu ve fibrozis düzeyini azaltmaktadır. Mutasyon doku ekspresyonunu azaltmakta ve bu etki karaciğerdeki inflamasyonu ve fibrozis düzeyini olumlu yönde etkilemektedir.

HCV enfeksiyonunda kemokinler karaciğer hasarını ilerletebilir. Gelecekte kemokin reseptör blokajı ve/veya modülasyonu inflamasyonu azaltmaları dolayısıyla başarılı tedavi markeri olarak değer kazanabilirler.

Yeni çalışmalarla elde edilecek bilgilerle, kemokinler ve reseptörlerinin HCV enfeksiyonunda potansiyel terapötik hedefler olabileceği düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: Kronik HCV, Kemokin, CCR5, gen polimorfizmi

SUMMARY

Hepatitis C virus is an important reason for cirrhosis and/or chronic liver disease which may lead to hepatocellular carcinoma. Intrahepatic inflammation and liver cell damage are significant properties of HCV infection. Chemokines which are cytokines attracting leucocytes to inflammatory sites have an important role in intrahepatic inflammation.

CCR532bpdel is a deletion mutation of chemokine receptor CCR5. As a result of this mutation there is significant deletion in the expression of CCR5 in tissues and periferic cells. Recent studies have shown that CD3 positive T cells derivating form CCR5 heterozygote mutations decrease CCR5 expression and its answer to ligands. Studies considering this knowledge have suggested that CCR5 mutation and expression may have a role in liver inflammation, and its modulation.

In this study our aim was to study the relation of the frequency of CCR5 mutation in chronic HCV patients, to find out the relation between CCR5 mutation, and it's expression in liver tissue, with histopathological findings in the liver. CCR5 mutations were genotyped with Multiplex PCR analysis products StripAssay Revers Hibrididation technics. Tissue expression was evaluated immunohistochemically.

The mean age oh our patients was 54.3 ± 10.5 , (25 male,33 famale). In the control group of 58 patients mean age was 58.82 ± 11.6 , with 38 male, and 20 female. When both groups were compared for mutation 5 patients (%8.6) in the patient group had CCR5 heterozygote mutation, in the control group 1 person (%1.7) was positive for mutation; the difference between the groups was not statistically significant ($p=0.206$).

The patient group was divided into two groups; mutation positive and negative. Viral load in the mutation positive group was $6.4 \times 10^6 \pm 2. \text{px} 10^5$ IU/ml, in the mutation negative group $2.8 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^5$ IU/ml. Viral load was significantly higher in the mutation group ($p=0.037$).

In the mutation positive group HAI (4.0 ± 1.0) was significantly lower than the mutation negative (5.7 ± 1.7) group ($p=0.022$). When the relation between ALT levels and mutation was investigated, lower values were obtained in the mutation positive group ($55.2 \pm 32.4; 65.6 \pm 38.5$), the difference was statistically significant ($p=0.582$).

When the effects of the mutation on fibrosis levels were investigated; in the mutation group fibrosis levels were 1.6 ± 1.3 , and in the group without mutation fibrosis levels were 2.6 ± 1.8 . Fibrosis levels were lower in the group with mutation but the difference was not statistically significant ($p=0.352$).

Immunohistochemical studies on the liver biopsies obtained from the hepatitis C patients attending the study showed that 15 subjects (%30) had intrahepatic CCR5 expression. There was no expression in thirty patients (%70). Because of technical reasons 8 patients could not be studied.

HAI was 6.1 ± 2.3 in patients with expression, 4.9 ± 1.3 in patients without expression. The difference was statistically significant ($p=0.034$). In the expression group fibrosis levels were 2.1 ± 2.1 while 1.9 ± 1.5 in the group without expression. It was lower in the group without expression, but the difference was not statistically significant ($p=0.625$).

In the patients with hepatitis C tissue expression was seen in 15 of 45 patients without mutation; there was no expression in the 5 patients with mutation. The difference was statistically not significant ($p=0.305$).

In conclusion, CCR5 polymorphism is more frequent in HCV positive patients than in healthy population. This mutation decreases liver inflammation, and fibrosis levels. The mutation decreases tissue expression, and this effect has a positive impact on liver inflammation, and fibrosis levels.

Chemokines may increase liver destruction in HCV infection. In the future chemokine receptor blockage and/or modulation may become important as an inflammation deceiver.

Chemokines and their receptors may be potential therapeutic targets in HCV infection with the help of the future studies.

Key Words: Chronic HCV, Chemokine, CCR5, gene polymorphism

KISALTMALAR

1. **ABP:** Avidin-Biyotin-Peroksidaz
2. **AFP:** Alfa Feto Protein
3. **BAL:** Bronkoalveolar Lavaj
4. **CCR2:** CC-Kemokin Reseptör 2
5. **CCR5:** CC-Kemokin Reseptör 5
6. **CCR5 Δ32:** 32 Baz Çifti Delesyonu
7. **DARC:** Duffy Antigen Receptor Chemokine
8. **ENA:** Epitelial Nötrofil Activating Factor
9. **HAI:** Histolojik Aktivite İndeksi
10. **HBV:** Hepatit B Virüs
11. **HCC:** Hepatocellular Cancer
12. **HCV:** Hepatit C Virüs
13. **HDV:** Hepatit D Virüs
14. **HIV:** Human Immunodeficiency Virus
15. **IFN-γ:** İnterferon Gama
16. **IL:** İnterlökin
17. **IP-10:** Gamma Interferon Inducible Protein
18. **I-TAC:** Inducible T cell α chemoattractant
19. **KHC:** Kronik Hepatit C
20. **LARC:** Liver and Activation Regulated Chemokine
21. **MHV:** Mouse Hepatitis Virus
22. **MCP:** Monocyte Chemoattractant Protein
23. **MIG:** Monokine Induced by IFN- γ
24. **MIP:** Macrophage Inflammatory Protein
25. **MMP:** Matriks Metalloproteinaz
26. **PCR:** Poymerase Chain Reaction
27. **PDGF:** Platelet Derived Growth Factor
28. **PF:** Platelet Factor
29. **PCT:** Porfiri Cutanö Tarda
30. **RANTES:** Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
31. **RIBA:** Recombinant Immunoblot Assay” (RIBA)
32. **SDF:** Stromal Cell Derived Factor
33. **TNF:** Tümör Nekrozis Faktör

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|--------|
| ÖZET | i |
| İNGİLİZCE ÖZET..... | ii |
| KISALTMALAR..... | iii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1-3 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 2.1. Hepatit C virüsü patofizyoloji..... | 4 |
| 2.2. Prevelans ve epidemiyoloji..... | 4-6 |
| 2.3. Epidemiyoloji ve korunma..... | 6 |
| 2.4. Bulaşma yolları..... | 7-12 |
| 2.5. Tanıda esaslar..... | 12-15 |
| 2.6. Klinik ve doğal seyir..... | 16-17 |
| 2.7. Tedavi..... | 17-18 |
| 2.8. Korunma..... | 19 |
| 2.9. Kemokinler..... | 20-28 |
| 2.10. Kemokinler ve kronik hepatit C..... | 28-31 |
| 3. Materyal ve Metod..... | 32 |
| 3.1. Genetik analiz..... | 33-39 |
| 3.2. Histopatolojik Ve İmmunohistokimyasal Çalışma Yöntemi | 38- 40 |
| 3.3. İstatistik analiz..... | 40 |
| 4. BULGULAR..... | 41-45 |
| 5. TARTIŞMA..... | 45-50 |
| 6. SONUÇLAR..... | 50 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 51-56 |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1992 yılında lökosit göçü, enfeksiyon hastalıkları ve inflamasyon, anjiyogenezis, hematopoezis ve organogeneziste rol alan bir grup sitokine kemotaktik sitokinlerden esinlenerek “Kemokin” adı verilmiştir (1). Kemokinler farklı hücre tiplerini aktive eden ve selektif olarak onlarla ilişki içerisinde olan bir polipeptid ailesidir. İnflamasyon, enfeksiyon, doku hasarı, allerji, kardiyovasküler hastalıklar, ayrıca malign tümör patofizyolojisinde rol alırlar (2).

İnflamasyonda ve enfeksiyonlara karşı konakçı cevabında lökositlerin dokulara yerleşimi önemli bir basamağı teşkil etmektedir. Bu süreç kemotaktik sitokinler olarak bilinen kemokinler tarafından kontrol edilmektedir. Kemokinler, inflamasyonda ve homeostazda lökositlere ve stem hücrelere kemotaksi yaptıran sitokinlerdir. Kemokinler, heparin bağlayan proteinlerdir ve lökosit migrasyonunu düzenlemekte, bunun yanında anjiyogenez ve lökosit degranülasyonu gibi süreçlerin de gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır (3).

Kemokinlerin organizmada gerçekleşen birçok biyolojik süreçte önemli rolleri bulunmaktadır. Kemokinler, lökosit-endotelyal hücre ilişkilerinde, T ve B hücre matürasyonunda, immün denetim, tolerans ve immünitinin oluşumunda, T-B hücre iletişiminde ve primer immün cevabın oluşmasında etkin olmaktadır (3).

Kemokin ailesinin hücreler üzerinde bağlandıkları 20 kadar kemokin reseptörü tanımlanmıştır. Kemokin reseptörleri G-protein-bağımlı türde hücre-içi sinyal ileten türde yapılardır. Kemokinlerin uygun reseptöre bağlanması sonucunda sinyal iletimi ile uyarılan hücreler, doku zedelenmesi, inflamasyon veya gerek görülen bölgeye migrasyon (kemotaksi) yapmak üzere harekete geçerler (3,4).

T helper (Th1) ilişkili kemokin reseptörlerinden olan CCR5 ve CXCR3 hepatit C virus (HCV) enfeksiyonunda hepatik inflamasyon oluşumuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (5,6). Kronik HCV enfeksiyonun ortaya çıkmasında ve viral klerenste bu reseptör ve ligandlarının ilişkisi tam olarak aydınlatılamamıştır.

CCR5 geninde 32-baz-çift delesyonu (CCR532bpdel) için homozigot olan bireyler HIV-1 enfeksiyonuna dirençli olup, heterozigot olan bireylerde ise hastalığın yavaş seyrettiği ve fırsatçı enfeksiyonlara karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalar doğrultusunda anti-kemokin ve kemokin reseptör blokaj tedavileri gündeme gelmiştir (7,8).

CCR532bpdel, CCR5 kemokin reseptörünün delesyon mutasyonudur. Bu mutasyon

sonucunda dokuda ve periferik hücrelerde CCR5'in ekspresyonunda önemli azalma görülmektedir. Bu nedenle CCR5 genotipi tayini HCV enfeksiyonlarında CCR5'in rolünün değerlendirilmesinde kullanılabilir. Yakın zamandaki çalışmalarda CCR5 heterozigot mutasyonundan türetilmiş CD3 pozitif T hücreleri CCR5'in ekspresyonunu ve ligandlara cevabını azalttığı gösterilmiştir (9).

Bu bulgular ışığında yapılan çalışmalarda CCR5 mutasyonu ve ekspresyonun karaciğer inflamasyonunun modülasyonunda rolü olabileceği bildirilmiştir(10). Woitas ve arkadaşları CCR5 mutasyon sıklığının HCV'li hastalarda normal popülasyondan daha yüksek olduğu ve bunun enfeksiyonun konak savunmasını etkilediğini bildirdiler (11). Buna karşın Promrat ve arkadaşları CCR5 mutasyonu ile HCV enfeksiyona yatkınlık ve sıklığı arasında korelasyon olmadığını bildirdiler (10).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda CCR5 mutasyonu ile HCV enfeksiyonu arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Bu çalışmalarda mutasyon saptanan hastalarda karaciğerdeki inflamasyonun ve fibrozis derecesinin daha düşük olduğu ve klinik seyrin daha yavaş olduğu bildirilmiştir (12-14).

CC subfamilyasından Th1 hücrelerle ilişkili olan kemokinler, aktivasyona göre düzenlenmiş, normal T hücresinden eksprese ve sekrete edilen kemokin (RANTES), ve makrofaj inflamatuvar protein(MIP)- 1 α ve - β 'y içerir. Bu kemokinler kendi reseptörleri olan CCR5 ile etkileşerek hücreleri çekerler. Bu kemokinlerin tamamının kronik hepatit C hastalarında periferik kan ve intrahepatik seviyelerinin yüksek olduğu bulunmuştur (3).

HCV ile enfekte kişilerde CCR5 eksprese eden intrahepatik T hücrelerinin oranı periferik kandakine kıyasla artmıştır ve sağlıklı kişilerde CCR5 ekspresyonunda bu fark yoktur (5,6,15). Enfekte olmayan kişilerin aksine az miktarda intrahepatik T hücresi CCR5 pozitif olan kronik hepatit C hastalarında portal ve lobüler T hücrelerinin çoğunluğu kemokin reseptörünü eksprese eder (5,6,15).

İntrahepatik RANTES ekspresyonu hepatositler, sinüzoidal endotel hücreleri ve biliyer epitelyum gibi çeşitli hücre tiplerinde gözlemlenmiştir. Bu alandaki çalışmalar kronik hepatit C (KHC) hastalarında intrahepatik ekspresyonun enfekte olmayan kişilere göre yüksek olduğunu raporlamıştır (5,16,17). Ayrıca RANTES-pozitif hücrelerin miktarının inflamasyonun derecesiyle korelasyon gösterdiği bulunmuştur(5). Ek çalışmalar HCV hastalarında yüksek hepatic RANTES mRNA ekspresyonu olduğunu raporlamışlardır (15,18-20).

RANTES sekresyonundaki ve CCR5 yüzey ekspresyonundaki değişiklikler

karaciğere lenfosit göçünü etkileyebilir. Konağın RANTES ve CCR5 ile ilişkili genetik polimorfizmi de ayrıca HCV hastalarındaki azalmış portal inflamasyon ve daha ılımlı olan fibrozis ile ilişkilidir. Spesifik olarak, fonksiyonel CCR5 protein ekspresyonunu önleyen bir çerçeve kayma mutasyonu olan CCR5-Δ32 ve artmış RANTES ekspresyonuna neden olan 403. pozisyondaki bir RANTES delesyon mutasyonu azalmış portal inflamasyonla ilişkilidir. (10-12). Bu bulgular CCR5-RANTES yolağının karaciğer inflamasyonuna potansiyel katkısını daha çok vurgulamaktadır.

Lökosit migrasyonundan sorumlu kemotaktik sitokinler olan kemokinlerin kronik HCV enveksiyonunda periferik kan ve intrahepatik seviyelerinin artmasından dolayı inflamasyon gelişiminde bir rol oynadıkları düşünülmektedir. Kronik HCV enfeksiyonu sırasında karaciğerdeki baskın hücreler Th-1 hücreleri olduğu için, Th-1 leri kendine çeken kemokinler karaciğer hücre hasarı ve intrahepatik inflamasyon gelişiminde özellikle önemli olabilirler.

Bu çalışmada; kronik HCV'li hastalarda CCR5 mutasyon sıklığının belirlenmesi; CCR5 mutasyonu ve karaciğer dokusundaki ekspresyonunun karaciğer histopatolojik bulguları üzerine etkisi araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEPATİT C ENFEKSİYONU PATOFİZYOLOJİ

Hepatit C virüsü, tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Geni tam olarak karakterize edilmiştir. HCV genomu 2 yapısal (kor ve zarf), 5 yapısal olmayan (helikal, proteaz, ve RNA polimeraz) proteini kodlar. Altı ana HCV genotipi tanımlanmıştır. Bunlar 1'den 6'ya numaralandırılmıştır. Genotipler alt gruplara ayrılmıştır (1a, 2a) gibi ve yaklaşık 50 tanesi tanımlanmıştır. HCV genotipinin coğrafi dağılımında kayda değer bir varyasyon görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.)'nde hastaların % 75'i genotip 1'dir (21).

HCV'nun genetik varyasyonunun klinik önemi vardır. Öncelikle genotip 1 ve 4, 2 ve 3'göre, interferon tedavisine karşı artmış bir direnç sahiptir. HCV zarf proteinlerinin aşırı farklılaşabilme özelliği virüsün konakçı bağışıklık sisteminden kurtulmasında ve enfeksiyonun kalıcılığında rol oynar. Bu aşırı değişken antijenik yapı nedeniyle HCV'na karşı aşı geliştirilmesi mümkün olamamaktadır (21-23).

HCV 'nin serumdaki seviyeleri HBV 'nin seviyelerinden daha azdır ve HCV antijenleri kanda belirlenemez. Kronik HCV hastalarında karaciğer biyopsisinde mikro veya makroveziküler steatozis (%50), safra yolu hasarı (%60), ve lenfosit agregatları ya da folikülleri (%60) görülebilmektedir. Hücre hasarının mekanizması tam olarak anlaşılmasa bile, bağışıklık sisteminin rol aldığı hasarın HCV enfeksiyonunda hepatite neden olduğu düşünülebilmektedir. HCV'nin direkt sitopatik etkisi bazı durumlarda bu hasara katkıda bulunabilmektedir (21).

2.2. PREVALANS VE EPİDEMİYOLOJİ

Amerika Birleşik Devletleri'nde kan yoluyla bulaşan en sık enfeksiyon Hepatit C virüsüdür. A.B.D. nüfusunun %1.8'i (3.9 milyon) HCV ile karşılaşmıştır ve yaklaşık 2.7 milyonu kronik enfeksiyonludur. Dünya nüfusunun %3 'ü (170 milyon) kronik HCV enfeksiyonuna sahiptir. A.B.D.'de kronik karaciğer hastalığının ve karaciğer naklinin en sık nedeni HCV enfeksiyonudur (21,22).

Hepatit C enfeksiyonu 1989'da HCV virüsünün tanımlanmasından sonra önemi giderek iyi anlaşılan dünya çapında bir sağlık sorunudur. Yalnızca hastalığın önemli ölçüde kronikleşerek ciddi karaciğer yetmezliği ve hepatoselüler karsinomaya yol açması ve yeni bir

karaciğer gerektirmesi değil, hastalığın sinsi seyretmesi, klinik belirti vermemesi ve enfekte kişilerin toplumda bir rezervuar oluşturması da onu farklı ve önemli kılmaktadır.

Dünya nüfusunun %3'ü HCV ile enfektedir. Yani 6 milyara ulaşan dünya nüfusunun yaklaşık 180 milyonu virüsü taşımaktadır (21-23). Ülkemizde yapılan çeşitli kohort çalışmalarına göre HCV sıklığı % 1-2.4 arasındadır. Kan donörlerinde bu oran %1 civarında iken risk gruplarında örneğin hemodiyaliz hastalarında,%51.6' ya kadar çıkmaktadır (24). Başlangıçta posttransfüzyon hepatitlerinin başlıca sorumlusu olan ve enfekte ettiği kişilerde neredeyse yaşam beklentisini değiştirmeyen bir hastalık gibi algılanan HCV 'nin zaman içinde hiç de öyle olmadığı, vakaların %85'inin kronikleştiği, karaciğer sirozundan olan ölümlerin ve nakil nedenlerinin başında geldiği sonradan yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Bu bağlamda HCV en sık görülen karaciğer hastalıklarının başında gelir ve önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Kronik HCV vakalarının % 20'sinde siroz gelişmekte, bunların da % 1-4 'ünde zaman içinde HCC gelişebilmektedir (25).

Son 15 yılda hastalığın bulaş yolları değişiklik göstermiştir Kan bankalarında HCV taramasının gündeme geldiği 1990'dan sonra transfüzyon HCV için başlıca bulaş yolu olmaktan çıkmış toplumdan kazanılan HCV olguları ile çeşitli tıbbi ya da, kozmetik girişimler, damar yolu ile ilaç kullanımı ve cinsel temas ile bulaşan hastalık daha önemli rol oynamaya başlamıştır.

Damar yolu ilaç kullananlarda ortak enjektör ile geçiş, Balkan ülkeleri ve önceki SSCB ülkelerinde hala önemini korurken, daha çok HIV korkusu ile dispozl enjektör kullanımı bu bulaş yolunu azaltmıştır. Hemodiyaliz hastaları, hemofili ya da talasemisi olanlar gibi özel gruplarda ise geçiş diğer gruplara göre yüksektir. Kan nakli ile HCV bulaş olasılığı günümüzde 100.000 de bir olup, taramada nükleik asit teknolojisi kullanıldığında bu olasılık 1/500.000 ila 1/1.000.000' a kadar düşmektedir. Sağlık personelinde hasta kanı ile enfekte iğne ya da batıcı alet batması sonucu HCV bulaşı HBVden düşüktür ve %2 civarındadır. Tek eşlilerde cinsel temasla HCV bulaşı ve anneden bebeğe perinatal geçiş eğer annede birlikte bir HIV enfeksiyonu yoksa düşük bir olasılıktır. (%0.5-2) (26-28).

Ülkemizde kronik hepatitlerin etyolojisinde HCV'nin rolü son yıllarda giderek artmaktadır. Ökten ve ark'nın yaptığı çalışmaya göre HBV enfeksiyonunun etyolojide hala önemini korumasına karşılık son 10 yılda HCV 'nin katkısı % 23'den % 38.1'e çıkmıştır. Benzer şekilde sirozların etyolojisinde HBV % 56.6'dan % 45.9'a inerken, HCV 'nin katkısı % 25.2'dan % 45.9'a yükselmiştir. Kuşkusuz burada HCV tanı testlerinin geliştirilmesinin önemi büyüktür (29). HCV geçişi ile ilgili risk faktörlerinin incelendiği bir başka çalışmada Yıldırım ve ark. HCV bulaşında en önemli etkenlerin küçük ve büyük cerrahi girişimler, kan

transfüzyonu, birden fazla cinsel partneri olma, sık diş tedavisi ve diş çektirme olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada HCV'li hastaların eşlerinde %1.8, çocuklarında ise %1.2 oranında HCV antikoruna rastlanmıştır. Ülkemizde HCV'de eş geçişi çeşitli çalışmalarda %0.78-7.8 arasındadır. Tahan ve arkadaşlarının retrospektif çalışmasında bu oran % 2 bulunmuştur (27). Tek eşlilikte görülen düşük geçiş ülkemiz için de geçerlidir. Ancak risk gruplarında, örneğin birden fazla partneri olanlarda bu oran %4.2 olarak bildirilmiştir (30).

2. 3. EPİDEMİYOLOJİ VE KORUNMA

Hepatit C virus ile ilgili serolojik testlerin 1989 yılından itibaren rutin olarak kullanılmaya başlanmasından sonra ilk prevalans çalışmaları değişik risk grupları arasında yapılmıştır.

Başlangıçta yapılan çoğu çalışmada ELISA ile saptanan anti-HCV seropozitifliği doğrulayıcı testler ile konfirme edilmediğinden yüksek oranlarda yalancı pozitiflik saptanmıştır. Daha sonra 2. ve 3. kuşak testlerin kullanılmaya başlanması, “recombinant immunoblot assay” (RIBA) ile doğrulanması, daha güvenilir sonuçlar sağlamıştır. Ülkelerin HCV ile ilgili verileri genellikle gönüllü kan donörleri arasında yapılan çalışmalara dayanmaktadır (21-23).

Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Orta ve Güney Amerikanın çoğu bölgesi,Avustralya, Afrika'nın bazı bölgeleri HCV enfeksiyonu açısından düşük endemik (%0.2-0.5) bölgelerdir. Brezilya, Doğu Avrupa, Akdeniz Bölgesi, Ortadoğu, Hindistan, Afrika ve Asya'nın bazı bölgeleri ise orta endemik (%1-5) bölgelerdir. En yüksek prevalans ise Mısır'dan bildirilmiştir (%17-26) . Ülkemizde kan donörleri arasında bildirilen anti-HCV sıklığı Avrupa ülkelerindekinden çok farklı olmayıp %0.6 dolayındadır (31)

2.4. BULAŞMA YOLLARI

2.4.1. PARANTERAL BULAŞMA

Meslek İle İlgili Bulaşma

Mesleki bulaşma; özellikle HCV enfeksiyonunun endemik olduğu bölgelerde çalışan sağlık personeli için oldukça ciddi bir risk oluşturmaktadır. Kaza ile enfekte hastada kullanılan kontamine iğnenin sağlık çalışanının cildine batması en önemli risk faktörü olabilir (31).

Prospektif çalışmalarda anti-HCV seropozitif kan ile kontamine iğnenin batması ile gelişen yaralanmalarda ortalama enfeksiyon riski hastane personeline yaklaşık %3-4 dolayındadır. ABD'de sağlık çalışanlarının genelinde bildirilen anti-HCV seroprevalansı %1.4 iken bu oran diyaliz ünitesinde çalışanlarda %2, ilaç bağımlılarının tedavi edildikleri kliniklerde çalışanlarda %10 ve hastane cerrahları arasında ise %0.9'dur (31).

Diş hekimleri HCV enfeksiyonu için özel bir risk taşımaktadırlar. Diş hekimleri arasında anti-HCV seroprevalansı ABD'de %2 iken, İtalya'da %6 oranında bulunmuştur. Diş hekimleri arasında seropozitiflik oranı ile bu hekimlerin tedavi ettiği hastalar arasında, intravenöz ilaç bağımlılarının sayısı, oral cerrahinin uygulanması, AIDS'li hasta, homoseksüel hasta ve meslek süresi ile paralellik göstermektedir.

Ülkemizde sağlık çalışanlarında anti-HCV antikor seroprevalansı %0.7 olarak saptanmıştır. Bu oran kan donörlerinden yüksektir ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Hemodiyaliz ünitelerinde çalışan sağlık personeline %2.5 gibi daha yüksek oranda anti-HCV seropozitifliği bulunmuştur. Konjonktivaya kan damlasının sıçramasıyla ilgili bir bulaş olduğu konusunda bir olgu sunumu olmasına rağmen, HCV enfeksiyonunun müköz membran veya bütünlüğü bozulmuş cilt ile temas sonucu bulaştığı kanıtlanmamıştır (32).

Kan ve Kan Ürünleri Transfüzyonu

Transfüzyonla ilişkili anti-HCV insidensi İngiltere'de %0.5, ABD'de %3-4, Tayvan'da %13 oranında bildirilmiştir. Kan donörlerinin anti-HCV ile test edilmesi transfüzyona bağlı HCV enfeksiyonunun sıklığını azaltmıştır. HCV non-disposabl enjektörlerin ve akapunkturun kullanılması ile iyatrojenik olarak da bulaştırılabilir.

Pıhtılaşma faktörlerinin ısıya duyarlı olması nedeniyle, viral inaktivasyon

uygulanmamış plazma konsantrelerinin hemofili A, hemofili B ve von Willebrand hastalığı gibi sık kan ve kan ürünü transfüzyonuna ihtiyaç gösteren hastalara kullanılmasıyla anti-HCV sıklığı bu grup hastalarda %84-100 gibi çok yüksek oranlarda tespit edilmiştir. Kontamine anti-D immunglobulini uygulanan kadınlarda da HCV salgını bildirilmiştir. Günümüzde kan ve kan ürünlerinin HCV açısından serolojik olarak tetkiki, monoklonal ve rekombinant faktör konsantrelerinin kullanımı bulaşma riskini en aza indirmiştir (31).

Nasokomial bulaşma

Hepatit C virusunun hastane ortamından bulaşması nosokomial bulaşma olarak tanımlanır ve genellikle HCV ile kontamine kan, kan ürünleri veya infekte solid organın transplantasyonu sonucu bulaşma olmaktadır. HCV ile infekte donör organlarının kullanılması sonucu alıcıların %24-48'nde HCV enfeksiyonu geliştiği bildirilmiştir. Anti-HCV pozitif 13 vericiden alınan organlar 29 alıcıya (19 böbrek, 6 kalp, 4 karaciğer) transplante edilmiş ve alıcıların %75'inde anti-HCV ve HCV-RNA pozitifleşmiştir. Nosokomial bulaşmaya en iyi bir örnek hemodiyaliz tedavisi altındaki kronik böbrek yetersizlikli hastalardır. Uzun süreli hospitalizasyonda HCV açısından bir risk faktörüdür. Özellikle pediatrik onkoloji ve hematoloji servislerinde hastadan hastaya bulaş bildirilmiştir (31).

Hemodiyaliz hastaları

Kronik böbrek yetersizliği nedeni ile hemodiyaliz tedavisi altında olan hastalarda HCV enfeksiyonu sıklığı genel popülasyona göre oldukça yüksek oranlarda saptanmıştır. Bu hastalar arasındaki HCV prevalansı ülkeler arasında ve aynı ülkedeki üniteler arasında farklılıklar göstermektedir. Bu hasta grubunda anti-HCV prevalansı Kuzey Amerika'da %8-39, Avrupa'da %1-54, Asya'da %17-51 oranlarında bildirilmiştir (33,34).

Ülkemizde, HCV sıklığının en yüksek olduğu hasta grupları, hemodiyaliz ve renal transplantlı hastalardır. Hemodiyaliz merkezlerinden %14-82.8 arasında değişen anti-HCV seropozitiflik oranları bildirilmiştir. Ortalama olarak kronik hemodiyaliz tedavisi altındaki olguların yarısının bu virus ile infekte olduğu saptanmıştır. Hemodiyalizde kalma süresi, nosokomial bulaşma, kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu en önemli risk faktörleridir. Hemodiyaliz programına hazırlanan hastalarda yapılan medikal, cerrahi ve endoskopik girişimler HCV'nin bulaşmasından sorumlu olabilir. Hemodiyaliz ünitelerinde hastadan hastaya ve replikatif HCV enfeksiyonu olan sağlık personelinde de hastaya (veya tersi) bulaşma söz konusu olabilir (33,34).

İntravenöz ilaç bağımlılığı

İntravenöz ilaç bağımlıları arasındaki anti-HCV seroprevalansı yüksektir ve ilaç kullanım süresi ile seropozitiflik oranı arasında bir paralellik söz konusudur. Ortak şırınga ve iğne paylaşımına bağlı olarak anti-HCV pozitifliği %40'ın üzerindedir. İntravenöz ilaç kullanan 716 hasta üzerinde yapılan çalışmada HCV seroprevalansı %64.7 olarak saptanmıştır. Ülkemizde 63 intravenöz ilaç bağımlısında yapılan araştırmada, %31.7 HCV-RNA pozitifliği saptanmış ve genotip 3a baskın olarak bulunmuştur (31).

2.4.2. NON PARENTERAL BULAŞMA

Cinsel yolla bulaşma

Hepatit C virusu cinsel yolla bulaşmaktadır, ancak bunun hangi oranda gerçekleştiği bilinmemektedir. HCV'nin cinsel yolla bulaşmasında cinsel ilişki yoğunluğu ve cinsel ilişki süresi arasında bir paralellik bulunamamıştır. Erken yaşta cinsel aktiviteye başlama, çok sayıda cinsel partner, cinsel temas ile bulaşan diğer hastalıkların varlığı ve prezervatif kullanmama ile HCV enfeksiyonu ilişkili bulunmuştur. Hayat kadınları arasında anti-HCV prevalansı %2-12 arasındadır (35).

HCV-RNA kan dışında; tükürük, seminal sıvı ve vajinal sekresyon gibi vücut sekresyonlarında, sensitivitesi yüksek PCR tekniği ile seyrek de olsa düşük titrelerde saptanmıştır. Bu sıvıların enfeksiyöz olup olmadıkları tartışmalıdır. Ancak genital ülserli, hematürili veya menstrüel kanamalı hastalarda HCV enfeksiyonu sıklığı artmaktadır. Kronik hepatit C enfeksiyonlu kadın hastaların tümünün menstürasyon kanında HCV-RNA tespit edilmiştir (35).

Bu çalışmaların aksine HCV-RNA seropozitif kronik hepatit C'li 34 hastanın katıldığı bir çalışmada seminal sıvı örneklerinde %24, tükürükte ise %48 oranlarında HCV-RNA tespit edilmiştir. Akut C hepatitli hastaların %10'unda son 6 aylık bir süre içinde HCV için risk grubunda bulunan insanlarla cinsel ilişki öyküsü alınmıştır (36).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; kronik C hepatitli hastaların eşleri arasında anti-HCV seroprevalansını %6-8 oranında saptanmıştır. İndeks vakalarla infekte eşlerin aynı HCV genotipi 1b olmasına rağmen ve hastalarda aynı diş ünitesinde tedavi gibi alternatif risk faktörlerinin de bulunması nedeniyle bulaşmanın cinsel yolla olmasının kesin olmadığı belirtilmiştir (27).

Perinatal bulaşma

Hepatit C virusunun perinatal geçişi düşük oranlardadır. Bu bulaşma şekli bölgesel farklılıklar göstermektedir. Geniş çaplı araştırmalar HCV-RNA seviyesi yüksek annelerden perinatal dönemde yeni doğana HCV'nin vertikal olarak geçebileceğini göstermiştir. Genellikle dolaşımda viral yükü yüksek olan anneler yeni doğanlarını infekte etmektedirler. Özellikle HCVRNA seviyesi >106 kopya/ml olan annelerden doğan bebekler arasında bulaşma riski %36 oranına kadar yükselmektedir. Ancak HCV'nin anneden bebeğe vertikal bulaşması HBV'ye oranla oldukça düşük olmasına rağmen perinatal dönemde HCV ile infekte olan bebeklerin büyük çoğunluğunda infeksiyon kronikleşmektedir (32).

İnfekte annelerin sütü ile beslenen bebeklerde HCV infeksiyon riski artmamaktadır. HCV-RNA pozitif annelerin emzirdiği 17 bebekte süt ile bulaşma saptanmamıştır. HCV pozitif 10 annenin hiçbirinin sütünde HCV saptanmaz iken 5'inin tükürük salgısında HCV-RNA tespit edilmiştir (37). Ülkemizde yapılan bir çalışmada; bir annenin sütünde HCV-RNA saptanmıştır (38).

Bebekler açısından HCV bulaşmasında anne sütünden ziyade tükürük salgısının daha riskli olduğu belirtilmektedir (39). Doğumun tipinin HCV'li hastalarda nasıl olacağı kesin değildir. Bazı çalışmalarda, vajinal yolla doğumun perinatal HCV geçişini arttırdığını bildirmektedir. Elektif şartlarda yapılmış sezeryanın acil şartlarda yapılmış sezeryana göre perinatal bulaşma riskini azalttığı gösterilmiştir (40).

Aile içi bulaşma

Hepatit C virusunun HBV gibi aile içi bulaşmasının söz konusu olduğu, özellikle virüsün orta derecede endemik olduğu yörelerde bir çok çalışmada bildirilmiştir. Anti-HCV seropozitif 225 hastanın 4530 aile bireyinde HCV infeksiyon sıklığı %4.9 oranında bulunmuştur ve bu oran kan donörlerinde saptanın prevalansın üstündedir (41). HCV'ye bağlı sirotik hastaların yakınlarında yapılan bir diğer çalışmada anti-HCV sıklığı eşlerde %12.5, çocuklarda %11.3 oranında bulunmuştur (42). Ülkemizde bildirilen aile içi bulaşma oranları %0-4.2 arasında değişmektedir (43).

2.4.3. DİĞER BULAŞMA YOLLARI

Bir çok çalışmada, düşük sosyoekonomik düzeyin HCV infeksiyonu açısından risk faktörü olduğu saptanmıştır. Tıraş bıçağı ve diş fırçası gibi kişisel malzemelerin ortak kullanımı perkütan bulaşmaya neden olabilir. Dövme, “piercing” (deldirme), cildi kesme,

sünnet töreni, kozmetik veya töresel uygulamalarda kullanılan kontamine aletlerin HCV'nin bulaştırılmasındaki rolü tam olarak aydınlatılmamıştır. Akut C hepatiti tanısı ile başvuran hastaların %1'inde risk faktörü olarak kulak deldirme veya dövme risk olarak gösterilmiştir (21-23).

HCV ile infekte tıbbi malzemelerin kullanımı da risk oluşturmaktadır HCV'nin kolonoskopik tetkik sırasında bulaştığı gösterilmiştir (44). Hepatit C virus enfeksiyonlu 320 hastayı içeren retrospektif çalışmada; ülkemizde HCV bulaşmasında; önlenebilir bir risk faktörü olan cerrahi operasyonlar birinci sırayı almaktadır (45).

2.4.4.KİMLER TARANMALI?

YÜKSEK RİSK

- 1992 yılından önce talasemi ve hemofili gibi transfüzyon gerektiren hastalıklar nedeni ile multipl kan ve kan ürünü transfüzyonu alanlar
- İntravenöz ilaç kullananlar

ORTA RİSK

- Uzun süreli hemodiyaliz tedavisi Multipl seksüel partner (heteroseksüel veya homoseksüel)
- Cinsel temasla geçen hastalık öyküsü Transplantasyon (İnfekte organ ile transplantasyon)
- Steril olmayan iğnelerle yapılan aşılama kampanyaları

DÜŞÜK RİSK

- Dövme öyküsü
- Akapunktur
- HIV enfeksiyonu
- Monogamik ilişki
- Nosokomial enfeksiyon (cerrahi tedavide infekte cihazların kullanımı)
- Aile içi bulaş (traş bıçağı, diş fırçası..)

MİNİMAL

- Sağlık çalışanında iğne batması
- Kontrol edilmiş kan ve kan ürünleri ile bulaşma

2.5. TANIDA ESASLAR

2.5.1. ANTİKOR TESTİ

HCV enfeksiyonunun tanısında kullanılan ilk basamak test ELISA temelli anti-HCV tayinidir. Bu test var olan yada geçirilmiş enfeksiyonu gösterir. ELISA'nın üç jenerasyonu geliştirilmiştir ve bunların hepsi çok duyarlı ve spesifiktir. ELISA III>%99 duyarlı ve spesifiktir. Enfeksiyona maruz kaldıktan sonraki ilk 20-150 gün (ortalama 50 gün) anti-HCV serokonversiyonu için pencere dönemi olarak sayılabilir. HCV IgM tetkiki mevcut değildir (21). Yanlış pozitif testler en sık kan vericileri gibi düşük riskli kişilerde görülmektedir. Yanlış negatif testler de genellikle diyaliz hastaları ve transplantasyon alıcılarını kapsayan immün bozukluğu olan hastalarda görülmektedir. Kan dönör popülasyonunda olduğu gibi yanlış pozitif testten şüphelenildiğinde, rekombinan immüno blot tahlili (RIBA) HCV Ab için teyit edici bir testtir (22).

2.5.2. VİROLOJİK TESTLER

Kronik HCV enfeksiyonunun teşhisindeki ikinci adım serumdaki HCV RNA'nın saptanmasıdır. Maruz kalımdan 7-21 gün sonra virüs saptanmaktadır. Bunun için üç çeşit tetkik vardır. Polimeraz zincir reaksiyon (PCR) ile kalitatif HCV RNA en duyarlı tekniktir ve 50 kopya/ml miktarı bile saptanabilmektedir. PCR ile kantitatif HCV RNA daha az duyarlı olup, 1000 kopya/ml'ye kadar virüs düzeyini tespit edebilmektedir (22,23). Son olarak branched-DNA tekniği en az duyarlı olanıdır ve 200.000 kopya/ml üzerinde güvenli sonuç verebilmektedir. Ancak, kantitatif ölçümler içinde aynı sonuçlara ulaşmada en başarılı olanıdır. Dünya Sağlık Örgütü'nün konsensus toplantısından sonra standart bir uluslararası birim (IU) geliştirilmiştir. Buna göre; 800.000 IU/ml eşik değer olarak kabul edilmiştir (21,23).

2.5.3. GENOTİP TAYİNİ

HCV teşhisi için HCV genotipi gerekli değildir fakat tedavi kararı verme açısından oldukça önemli ve yanıtı predikte etme açısından gerekli bir bilgidir. Saptanmış RNA'sı olmayan hastalarda genotip testi yapılmaz (21). Hepatit C infeksiyonunda tedavi süresi ve tedaviye yanıt olasılığını belirlemek için tedavi öncesi dönemde genotip tayini yapılmalıdır. HCV infeksiyonu tedavisi için testleri uygulayan tüm laboratuvarların iç ve dış kalite kontrol programları yürütüyor olması gereklidir(22).

En son olarak 2005 yılında yapılan bir toplantıda, yapılan filogenetik analizler sonucunda HCV'nin 6 ana genotip ve bunların altındaki farklı sayıda subtiplerden oluştuğu uzlaşmasına varılmıştır. Avrupa'dan son zamanlarda yapılan çalışmalarda, genotip 1a ve 3a'da artış, genotip 2a/c ve gençlerde 1b'de azalma bildirilmektedir. Bu bulgular damar içi ilaç kullanıcılarında baskın olan genotipin 1a ve 3a olmasından ve bu kişilerin bulaşta rol oynamasından ve hızlı göç hareketlerinden kaynaklanmaktadır. Ülkemizde de değişik gruplar değişik zamanlarda HCV genotiplerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapmışlar ve baskın genotipi 1b (%68-94) olarak bulmuşlardır. Bu çalışmaların hepsi göz önünde bulundurulduğunda; genotip 1b'nin yanında, %2-19 arasında 1a, %2-5 oranında 2a, %1-4 arasında ise tip 4 bulunduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda ülkenin değişik bölgelerinde yapılan çalışmalar da ilk sonuçları doğrular niteliktedir (46).

2.5.4. KARACİĞER FONKSİYON TESTİ

Tanı için aminotransferazların artmış olması gerekli değildir. Kronik HCV'li hastaların %30'u sürekli olarak normal ALT'ye sahiptir. ALT düzeyleri normal olan bireyler, yüksek olan bireylerden daha gençtir ve daha az kiloludur. Fakat, cinsiyet, ırk, bazal viral yük ve HCV genotipi ALT düzeylerini etkileyebilir. Tedavi öncesi biyopside normal ALT'ye sahip hastaların %50'sinin histolojik aktivite indeksi 7 ve üstünde, %11'inin fibrozis skoru 3 ve 4 olarak bulunmuştur. Bu oranlar yüksek ALT'lilerde %73 ve %25'tir (21-23).

2.5.5. KARACİĞER BİYOPSİSİ

Karaciğer hasarının boyutu girişimsel-dışı bir yöntemle saptanamadığından, inflamasyonun ve fibrozisin derecesini doğru olarak değerlendirmek için karaciğer biyopsisi

gerekmektedir. Biyopsi, tedavi başlaması ve tedavi süresini belirlenmesi kararını vermede yararlıdır. Hepatit C üzerinde yapılan “NIH konsensus geliştirme konferansı”da tedavi öncesinde tüm hastalara biyopsi tavsiye edilmiştir. Bununla beraber, sonuçların tedavi biçimini değiştirmedeği bazı vakalarda biyopsi olmadan tedavi yapılabilir (21-23).

2.5.6. KRONİK C HEPATİTİ HİSTOLOJİSİ VE SKORLAMA SİSTEMİ

Kronik C hepatitinde izlenen morfolojik bulgular diğer kronik hepatitlerde de görülen genel kronik hepatit bulguları (elementer lezyonlar) ve kronik hepatit C'ye özgü bulgular olarak ikiye ayrılabilir. Bu bulgular olgularda değişik derecelerde bulunurlar (47).

2.5.7. KRONİK HEPATİTTE HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Kronik Hepatitlerde Görülen Genel Özellikler (Elementer Lezyonlar)

Portal infiltrasyon

“Interface” hepatit (arayüz hepatiti)

Lobül içinde nekro-inflamasyon (fokal nekroz= fokal nekroinflamasyon)

Parankim rejenerasyonu bulguları

Hepatik safra kanalı hasarı (non-destrüktif lenfositik kolanjit)

Fibrozis

Kronik Hepatit C'ye özgü değişiklikler:

* Hepatositlerde makroveziküler steatozis

* Portal alanlarda lenfosit kümeleri ve germinal merkez oluşumu

Kronik C hepatitinde karaciğer biyopsisi tanının doğrulanmasını, diğer hastalıkların ekarte edilmesini, hepatit C'ye eşlik eden lezyonların (steatohepatit, demir birikimi) belirlenmesini ve hepatitin derece ve evresinin saptanmasını sağlar. Klasik olarak, kronik hepatitin nekroinflamatuvar aktivitesi olarak tanımlanan derece (grade) ile fibrozis ve yapısal değişikliklerin derecelendirildiği evrenin (stage) skorlanması tüm skor sistemlerinin hedefidir. Kronik hepatitin aktivite derecesi ve evresinin belirlenmesi için geliştirilmiş çeşitli skorlama sistemleri vardır (48-50). Tüm dünyada en sık kullanılan skorların değerlendirdikleri parametreler ve verilen sayısal değerler Tablo 2. 1'de verilmiştir.

Tablo 2.1.Knodell, Metavir ve Ishak skorlarının değerlendirdikleri parametreler ve sayısal değerleri

| KNODELL SKORU (17) | ISHAK SKORU (18) | METAVIR SKORU (19) |
|--|--|--|
| <p>Periportal+/- Köprüleşme nekrozu Yok=0 Hafif =1, Orta (portal alanların çevresinin %50sinden azı)= 3 Belirgin (portal alanların çevresinin %50sinden fazlası)=4 Orta derece piecemeal + köprüleşme nekrozu= 5 Belirgin piecemeal+ köprüleşme nekrozu= 6 Multilobüler nekroz= 10</p> | <p>Periportal veya periseptal interface hepatit Yok=0 Hafif (fokal, az sayıda portal alan)=1 Hafif/orta (fokal, çoğu portal alanda)=2 Orta (portal alan veya septumların %50'den azı)= 3 Şiddetli (portal alan veya septumların %50'den çoğu)=4</p> | <p>Piecemeal nekrozu Yok=0 Hafif=1 Orta=2 Ağır=3</p> |
| | <p>Konfluent nekroz Yok=0 Fokal konfluent nekroz=1 Bazı alanlarda zon 3 nekroz=2 Çoğu alanlarda zon 3 nekroz=3 Zon 3 nekroz+ nadir P-S köprüleşme=4 Zon 3 nekroz+ multipl P-S köprüleşme=5 Panasiner veya multiasiner nekroz= 6</p> | |
| <p>Lobül içi dejenerasyon ve fokal nekroz Yok= 0 Hafif (asidofil cisimler, balon dejeneresans ve/veya lobül yada nodüllerin 1/3'ünden azında dağılık hepatosellüler nekroz)= 1 Orta (1/3-2/3)= 3 Belirgin (2/3'ten fazla)= 4</p> | <p>Fokal nekroz, apoptoz ve fokal inflamasyon Yok=0 10xBB'de 1 veya daha az=1 10xBB'de 2-4=2 10xBB'de 5-10=3 10xBB'de 10'dan fazla= 4</p> | <p>Lobüler nekroz Yok/hafif=0 Orta=1 Ağır=2</p> |
| <p>Portal Yangı Yok=0, Hafif (portal alanların 1/3'ünden azında serpilmiş yangısal hücreler)= 1 Orta (1/3-2/3 artmış yangısal infiltrasyon)= 3 Belirgin (2/3'ten fazlasında yoğun yangı hücreleri)= 4</p> | <p>Portal İnflamasyon Yok=0 Hafif, bazı veya tüm portal alanlarda=1 Orta, bazı veya tüm portal alanlarda=2 Orta/belirgin, tüm portal alanlarda=3 Belirgin, tüm portal alanlarda=4</p> | |
| <p>Fibrozis Yok=0 Fibröz portal genişleme=1 Köprüleşme fibrozisi= 3 Siroz=4</p> | <p>Yapısal değişiklik, fibrozis ve siroz Yok=0 Bazı portal alanlarda fibröz genişleme (kısa fibröz septa var veya yok)=1 Çoğu portal alanlarda fibröz genişleme (kısa fibröz septa var veya yok)= 2 Çoğu portal alanlarda fibröz genişleme+ nadir portal-portal köprüleşme= 3 Portal fibröz ekspansiyon+ belirgin P-P veya P-S köprüleşme=4 Belirgin köprüleşme (P-P ve P-s) nadir nodül (inkomplet siroz)=5 Siroz(muhtemelen veya kısmen)=6</p> | <p>Fibrozis Yok=0 Yıldızimsı genişleme septa yok=1 Portal alan genişlemesi+seyrek septa=2 Çok septa, siroz yok=3 Siroz=4</p> |

2.6. KLİNİK VE DOĞAL SEYİR

İnkübasyon süresi 2-22 (orta değer 7.5 hafta)haftadır.Nadiren akut hepatit kliniği bulunur.Fakat retrospektif çalışmalar hastaların %10-20'sinde sarılıkla giden akut enfeksiyon tablosunun olduğunu ortaya koymaktadır.Hepatit C ile karşılaşan hastaların %60-85'inde kronik enfeksiyon gelişir.Bir kez kronik enfeksiyon geliştiğinde kendiliğinden virüs klirensi olması çok nadirdir.

Kronik C hepatiti olan hastaların çoğunda ALT düzeyleri hafif veya orta düzeyde yüksektir.ALT düzeyleri yüksek olan hastalarda,ALT düzeyi ile histolojik bulgular arasında korelasyon bulunmamaktadır.Bazı hastalarda halsizlik ve / veya sağ üst kadranda hafif ağrı gibi şikayetler olabilir.

Hastalar bazen kliniğe son dönem karaciğer hastalığının komplikasyonları veya kriyoglobulinemi ve porfiri kutanö tarda (PCT) gibi karaciğer dışı bulgularla gelebilir.Eğer hastada purpura mevcut ise hepatit C yönünden araştırmalı; sonuçlar hepatit C yönünden pozitif ise hepatit C tedavi edilmelidir. PCT'da güneşe maruz kalan bölgelerde özellikle el sırtında döküntüler olur. Birçok hastada demir testleri bozulmuştur. PCT'nin hepatit C tedavisinde verdiği cevabın sonuçları, kriyoglobulinemideki kadar net değildir. Flebotomi PCT'da döküntülere iyi gelmektedir ve ilk basamak tedaviyi oluşturur (21-23).

HCV ile infekte hastaların %30'unda ALT düzeyleri devamlı normal seyretmektedir. Bu hastaların enzimleri yüksek olan gruba göre histolojik bulguları daha hafiftir ve hastalığın progresyon gösterme ihtimali daha azdır.Bu hasta grubunda karaciğer biyopsisi yapma ve hastalara tedavi verme konuları halen tartışmalıdır.

Hepatit C'ye bağlı mortalite ve morbiditelerin hemen hemen tek nedeni sirozdur.Hastaların ancak %20-30'u 10-20 yıllık bir süreçte siroza ilerlemektedir.Hastalığın progresyonu ile ilgili birçok faktör üzerinde durulmaktadır.Bunlar;enfeksiyonun süresi,günde 50g /dl'den fazla alkol almak, ve erkek cinsiyettir.Genellikle HCV 20 yıl zarfında siroza yol açmaktadır (21,22).

Belki de siroza gelişmesi yönünden en önemli prediktif faktör hastalığın tespit edildiği zamanki histolojik bulgular düzeyidir.Histolojik bulgular eğer bilinebiliyorsa hastalığın süresi ile birlikte değerlendirilmelidir.Örneğin;20 yıllık bir enfeksiyon sonucunda yapılan biyopside sadece hafif portal hepatiti olan ve fibrozisi olmayan bir hastanın progresyon göstermesi aynı süre fakat daha ileri histolojik bulgulara sahip bir hastaya göre düşük bir ihtimaldir.Daha aktif bir hastalığın histolojik göstergeleri;orta şiddette inflamasyon ve nekrozis ile periportal veya septal fibrozistir. Hepatit C tedavisi planlanan her hastaya karaciğer biyopsisi yapılmalıdır.

Biyopsi bulguları tedaviye karar vermede yardımcı olabilir (21-23).

2.7. TEDAVİ

Kronik C hepatit tedavisinde önemli gelişme Pegylated (Peg) PegIFN' nun elde edilmesidir. Bu ilaç sayesinde IFN'un yarılanma ömrü uzatılmıştır. PegIFN (PegIFN-alfa 2a, PegIFN-alfa 2b)+Ribavirin tedavisi ile genotip 1 hastalarında %46-%50, genotip 2-3 hastalarında %70-80, genotip 4 hastalarında %69-70 kalıcı cevap sağlanmaktadır Tedavinin hedefi, tedavi bitiminden 24 hafta sonraki dönemde HCV RNA'nın negatif kaldığı kalıcı viral yanıtıdır (51).

Kronik C hepatitinde standart tedavi pegile interferon ve ribavirin kombinasyonudur. Bu kombinasyon ile 6-12 aylık bir tedavi ile %55'lik kalıcı yanıt alınabilmektedir. Kalıcı yanıt ihtimali yüksek olan hastalar; genotip 2-3 , HCV RNA düzeyi 2 milyon kopya /ml'den az olanlar, fibrozisi olmayan yada sadece portal bölgede olanlar, kadınlar ve 40 yaşından gençlerdir (22,23).

Kombinasyon tedavisinde görülen yan etkilerin çoğunluğu interferona bağlıdır. Ribavirin'in en önemli yan etkisi hemolitik anemidir. Bu yan etki anemiyi tolere edemeyen örneğin koroner arter hastalığı olanlar için önemlidir. Hemoglobinin 3g/dl kadar düşmesi sık görülür. Hemoliz, tedavinin kesilmesi ile düzelir. Hemoglobin düzeylerinde en belirgin düşme tedavinin 4. haftasında görülür ve tedavi boyunca aynı şekilde devam eder. Ribavirin idrarla atılır ve son dönem böbrek yetersizliğinde kontraendikedir. Vaskülitte bağlı krioglobulinemi gelişen kronik C hepatiti hastalarında tedavi verilmelidir. Yine uzun yaşam süresi beklenen örneğin 40 yaşın altında olanlarda biyopsiye bakılmaksızın tedavi verilebilir (22,23).

Hepatit C interferon ve ribavirinle tedavisinde kontraindikasyonlar (22)

- Dekompanze siroz
- Takipte uyumlu olmayacak hasta
- Majör depresyon
- Lökosit<3x10⁹/L, trombosit<60x10⁹/L, hemoglobin<11g/dL
- Majör otoimmün hastalık
- Tedavi edilmemiş tiroid hastalığı
- Belirgin koroner arter hastalığı

Yine tedaviye cevap oranı çok yüksek olan genotip 2 ve 3'lü hastalarda biyopsi

yapılmaksızın tedavi verilebilir.Tedavi bulaşma kaynaklarının ortadan kaldırılması amacı ile de düşünülebilir.Örneğin;invaziv girişim ile uğraşan sağlık çalışanları gibi.Tek başına interferon tedavisinin akut C hepatitindeki başarı oranı çok yüksektir (21-23).

Tedavi endikasyonu olan kronik C hepatitli hastaların hepsine tedaviyi tolere edebiliyorlar ise 3 ay süre kombinasyon tedavisi verilmelidir.Bu sürede HCV RNA kantitatif olarak ölçülmeli, tedavi öncesi düzeylerine göre 2 log dan az düşme var ise bu hastalarda kalıcı cevap beklenmediğinden tedavi kesilmelidir.Tedavinin 6. ayında HCV RNA'sı pozitif devam eden hastalarda da tedaviyi uzatmanın yarar getirmeyeceği bilindiğinden hastalar cevapsız kabul edilip tedavi kesilmelidir.Tedavi bitiminden 6 ay sonrada HCV RNA negatif olan hastalarda kalıcı cevap elde edilir ve bu hastalara bundan sonra bu şekilde gidecekleri gözü ile bakılır (23).

Tedavi adayı olmayan hastalar her yıl rutin karaciğer testleri ile takip edilmemelidir.Erken dönemde olan hastalar için progresyonu değerlendirmek amacı ile 3-5 yılda bir karaciğer biyopsisi ile takip önerilmektedir.Siroz gelişmiş hastalarda özellikle alkol kullanımı da var ise hepatosellüler kanser gelişme riski artmıştır.Hepatit C 'ye bağlı siroz hastalarında yıllık hepatosellüler kanser görülme oranı %1.4-4'tür (22).

Karaciğer nakline, rezeksiyona veya transarteral kemoembolizasyona aday olabilecek hastalar 6-12 ayda bir USG ve AFP ile takip edilmelidir.Hepatit C 'ye bağlı sirozu (hepatosellüler kanseride olanlar) olanlar karaciğer nakline adaydır.Child-Pugh skoru ≥ 7 olanlar kontraendikasyon yok ise transplantasyon listesine alınabilir. Karaciğer nakli yapılan hastalarda transplant sonrası viremi yaygındır ve takılan karaciğerde de zamanla hitolojik değişikliklerin olması sıktır.Tüm bunlara rağmen yaşam süresi iyi düzeydedir ve hepatit C' ye bağlı karaciğer nakilleri ABD'ye ilk sırada yer almaktadır (22,23).

Tedavi Planlamasında Ayrıcalıklı Durumlar

Kronik Hepatit C'de genotip 2 ve 3 hastalarında olduğu gibi altta yatan fibrozisin evresine bakılmaksızın antiviral tedavi uygulanabilen klinik durumlar vardır. Bunlar; semptomatik krİyoglobulinemi, non hodgkin lenfoma ile birlikte olan HCV, erken kronik böbrek yetmezlikli hastalar, HIV ile koenfekte hastalardır. Kronik hepatit C'de insülin rezistansı sıktır (vucut-kitle indeksi normal olanlarda %35, kilo fazlalığı olanlarda daha fazla). Başarılı antiviral tedavi insülin rezistansında düşme sağlayabilir. Bu durumda insülin direnci diğer erken antiviral tedavi endikasyonudur (51).

2.8. KORUNMA

Hepatit C' nin aşısı yoktur.İğne batması ile bulaşma nadirdir.Ama yine de bu durumda takip önerilir.Bazal anti-HCV test ile birlikte bulaşma ihtimali olabilecek durumdan 4 hafta sonra HCV RNA'da istenir.Akut infeksiyonun ortaya konulması ve tedavisi ile kronik infeksiyondan korunulur.Perinatal bulaşma çok nadirdir ve annede birlikte HIV infeksiyonu var ise bulaştırıcılık artar.Anneden bebeğe geçen anti-HCV 18 ay süre ile bebekte bulunabilir bu nedenle bu testin yararı yoktur.Bu durumda HCV RNA bakmak uygun olur (22).

HCV pozitif olan hastalarda kan veya organ bağışısı kabul edilmez.Açık yarası olan hepatit C' si olan hastaların bakımında dikkatli olunmalıdır.Cinsel yol ile bulaşma nadirdir,fakat birden çok partneri olanlara kondom önerilir.Tek cinsel partneri olanlarda ise partner HCV yönünden bilgilendirilir (21,22).

2.9. KEMOKİNLER

Geçen yüzyılda patologlar, lökositlerin kandan dokuya kapiller damar duvarından geçerek gittiklerini ve inflamasyon olan dokuda biriktiklerini biliyorlardı. “Diapedez” olarak isimlendirilen bu göçün amacının bakteriyi yakalamak, öldürmek olduğu ve bağışıklık sistemi için ne kadar önemli olduğu Elias Metschnikoff bunu gösterene kadar bilinmiyordu. Bugün interlökin-8 (IL-8)’in bulunuşundan 10 yıl sonra kemokinlerin lökosit göçünde ne derece önemli bir yere sahip olduğu artık bilinmektedir (1).

1992 yılında lökosit göçü, enfeksiyon hastalıkları ve enflamasyon, anjiyogenezis, hematopoezis ve organogeneziste rol alan bir grup sitokine kemotaktik sitokinlerden esinlenerek “Kemokin” adı verilmiştir (1).

Kemokinler farklı hücre tiplerini aktive eden ve selektif olarak onlarla ilişki içerisinde olan bir polipeptid ailesidir. İnflamasyon, enfeksiyon, doku hasarı, allerji, kardiyovasküler hastalıklar, ayrıca malign tümör patofizyolojisinde rol alırlar. Bu ana kadar bilgilerimiz dahilinde kemokin ailesine ait 30 adet kemokin ve 20 adet kemokin reseptörü tanımlanmıştır. Kemokinlerin gerçek doğası üzerine belirli cevapları vermek ve tedavideki hedefleri belirlemek için hayvan deneyleri ile uygun cevaplar almak gerekmektedir (1-3).

İnflamasyonda ve enfeksiyonlara karşı konakçı cevabında lökositlerin dokulara yerleşimi önemli bir basamağı teşkil etmektedir. Bu süreç kemotaktik sitokinler olarak bilinen kemokinler tarafından kontrol edilmektedir. Kemokinler, inflamasyonda ve homeostazda lökositlere ve stem hücrelere kemotaksi yaptıran sitokinlerdir. Kemokinler, heparin bağlayan proteinlerdir ve lökosit migrasyonunu düzenlemekte, bunun yanında anjiyogenez ve lökosit degranülasyonu gibi süreçlerin de gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır (1).

Kemokinlerin organizmada gerçekleşen birçok biyolojik süreçte önemli rolleri bulunmaktadır. Kemokinler, lökosit-endotelyal hücre ilişkilerinde, T ve B hücre matürasyonunda, immün denetim, tolerans ve immünitinin oluşumunda, T-B hücre iletişiminde ve primer immün cevabın oluşmasında etkin olmaktadır. Ayrıca, dendritik hücre fonksiyonlarında, T hücre farklılaşması ve fonksiyonlarının sağlanmasında, efektör T hücre cevabı ve inflamatuvar hastalıklarda, mukozal immünitide, embriyolojik gelişimin düzenlenmesinde, lenf organ gelişiminde, transplant rejeksiyonunda ve HIV-1 virüsünü de içeren çeşitli virüsler tarafından konakçı immün cevabı baskılayan olaylarda rol oynamaktadırlar (1-3).

2.9.1. Kemokinlerin Moleküler Yapısı

Kemokinler 8-10 kilodalton (kd) ağırlığında, %20-70 oranında aminoasit dizilimlerinde benzerlik gösteren proteinlerdir. Sistein kalıntılarının pozisyonlarına ve genetik yapılarına göre 4 alt gruba ayrılırlar (4).

Moleküldeki cystein (C) amino asidinin pozisyonuna göre; CXC, CC, C ve CX₃C şeklinde 4 alt gruba ayrılırlar. Alfa-kemokinler, amino terminal ucundaki iki cystein arasında bir amino asit bulunduğu için CXC kemokinleri olarak tanımlanır. Beta-kemokinler ise uçtaki cystein'ler yan yana oldukları için CC-kemokinler olarak isimlendirilir. Kemokin ailesinin hücreler üzerinde bağlandıkları 20 kadar kemokin reseptörü tanımlanmıştır. Kemokin reseptörleri G-protein-bağımlı türde hücre-içi sinyal ileten türde yapılardır. Kemokinlerin uygun reseptöre bağlanması sonucunda sinyal iletimi ile uyarılan hücreler, doku zedelenmesi, inflamasyon veya gerek görülen bölgeye migrasyon (kemotaksi) yapmak üzere harekete geçerler(3,4).

Tüm kemokinler; en azından 3 β tabakası ve C terminal alfa heliks yapısı açısından benzerlik gösterirler. CXC kemokin ailesi olarak da bilinen alfa kemokin ailesinde N terminaline yakın 2 sistein aminoasidi farklı bir aminoasit tarafından ayrılmıştır. Bu kemokinin kromozomu 14q12-21 üzerindedir. Bu grupta sadece SDF-1 α (Stromal cell derived factor) 10 kromozomundadır. Alfa kemokinler nötrofillere etki ederken; lenfositlere karşı etki göstermezler. CC kemokinlerde (beta kemokin) alfa kemokinlerden farklı olarak N terminaline yakın 2 sisteini ayıran aminoasit yoktur. β kemokin geni 17q 11.2-12 dedir. Sadece MIP-3 α (Macrophage inflammatory protein) kromozomu 9 da, MIP-3C/ LARC (MIP-3 α / liver-and activation-regulated chemokine) da kromozom 2'dedir.. β kemokinler de kendi içinde 5 MCP (Monocyte chemoattractant protein) ve eotaksin içeren MCP-eotaksin ailesi ve diğer β kemokinler olmak üzere 2 alt gruba ayrılır. CC kemokinler ise genellikle nötrofillere karşı etki göstermezken, monosit, eozinofil, bazofil ve lenfositlere değişik derecelerde etki ederler (1-3).

C kemokin olarak adlandırılan Lenfotaktin tek sistein içerir, kromozomu ise 1q23'dedir. CX₃C kemokin, ise Fraktalkin veya Nörotaktin olarak adlandırılmaktadır ve geni 16. kromozomda bulunmaktadır (1).

CXC kemokinler N terminallerinde glutamikasit-lözin-arginin (Glu-Leu-Arg) dizilimi gösterenler (ELR kemokinler) ve göstermeyenler (non-ELR kemokinler) olarak 2 alt gruba ayrılırlar. Glu-Arg-Leu diziliminin yokluğu nötrofilere karşı olan etkilerinin zayıf olmasına

neden olur. Bu grupta PF-4 (Platelet factor), IP-10 (Gamma interferon inducible protein) ve MIG (Monokin induced by interferon gamma) bulunur. PF-4'ün N terminali Glu-Leu-Arg olarak değişirse IL-8 reseptörlerine bağlanabilir ve nötrofillere karşı güçlü etki gösterir (3). Kemokinlerin hedef hücreleri ve biyolojik aktiviteleri tablo 2.2'de gösterilmiştir (1).

CC kemokinleri RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) T-memory hücrelerinin bu kemokine en yüksek afiniteyi göstermesiyle birlikte; RANTES T-memory hücrelerinin, monositlerin, bazofillerin, eozinofillerin, NK hücrelerinin, dendridik hücrelerin ve mast hücrelerinin migrasyonunu düzenler (3).

RANTES sadece CCR5 ile değil aynı zamanda CCR1, CCR3 ve CCR4 gibi G-proteini ile kenetli diğer çeşitli reseptörler ile etkileşerek migrasyona aracılık eder. RANTES fibroblastlar, T-lenfositler, monositler/makrofajlar ve epitelyal hücreler tarafından, bir hücrel hasar sinyali olan TNF- α veya T-hücre aktivasyonu gibi çeşitli faktörlerin uyarısından sonra saatler içerisinde kısa sürede üretilir. Ayrıca HCV ve diğer virüsler de RANTES ekspresyonunu uyarır (1-3).

Tablo 2.2. Kemokinler, hedef hücreleri ve biyolojik aktiviteleri

| KEMOKINLER | HEDEF HÜCRE | BIYOLOJİK AKTİVİTELERİ |
|-------------------------|---|---|
| CXC Kemokin | | |
| ELR | | |
| IL-8 | Nötrofil, T lenfosit, bazofil, endotel hücresi | Kemotaksis, adezyon, süperoksit, histamin ve granül salınımı, mitogenezis, anjiogenezis |
| GRO- α (MGSA) | Nötrofil, endotel hücresi, melanosit | Kemotaksis, adezyon, anjiogenezis, aktivasyon |
| GRO-p (MIP-2 α) | Nötrofil, endotel hücresi | Kemotaksis, adezyon, anjiogenezis, aktivasyon |
| GRO-y (MIP-2 p) | Nötrofil, endotel hücresi | Kemotaksis, adezyon, anjiogenezis, aktivasyon |
| ENA-78 | Nötrofil | Kemotaksis, aktivasyon |
| GCP-2 | Nötrofil | Kemotaksis |
| CTPA-III | Fibroblast | Kemotaksis |
| B-Tromboglobulin | Fibroblast | Kemotaksis |
| NAP-2 | Nötrofil | Kemotaksis |
| Non-ELR | | |
| Platelet factor-4 | Fibroblast, endotel hücresi, aktive T lenfosit | Kemotaksis, anjiogenez inhibisyonu |
| IP-10 | endotel hücresi, NK hücresi | Kemotaksis, sitolitik aktivite, anjiogenez inhibisyonu |
| MIG | Aktive T lenfosit | Kemotaksis |
| SDF-1 α | T lenfosit, CD34(+) progenitör, B lenfosit | Kemotaksis |
| CC Kemokin | | |
| MCP-1 | Monosit, memory-T lenfosit, bazofil, NK hücresi, hematopoietik progenitörler, dentritik hücre | Kemotaksis, adezyon, silperoksit, histamin salınımı |
| MCP-2 | Monosit, memory-T lenfosit, eozinofil, bazofil, NK hücresi | Lökotrien sentezi, araşidonik asit aktivasyonu, histamin salınımı |
| MCP-3 | Monosit, memory-T lenfosit, eozinofil, bazofil, NK hücresi, dentritik hücre | Kemotaksis, araşidonik asit aktivasyonu, histamin salınımı |
| MCP-4 | Monosit, T lenfosit, eozinofil | Kemotaksis |
| MIP-1 α | Monosit, T lenfosit, NK hücresi, bazofil, eozinofil, dentritik hücre, hematopoietik progenitörler | Kemotaksis, adezyon, kollojenaz, histamin ve katyonik protein salınımı, tümör sitotoksitesi |
| MIP-1p | Monosit, T lenfosit, dentritik hücre, hematopoietik progenitörler | Kemotaksis, adezyon, anjiogenez inhibisyonu |
| RANTES | Memory T lenfosit, NK hücresi, bazofil, eozinofil, dentritik hücre, | Kemotaksis, adezyon, histamin ve katyonik protein salınımı |
| Eotaksin | eozinofi | Kemotaksis |

Rollins BJ. Chemokines. Blood 1997;90:909-928

2.9.2.KEMOKİN RESEPTÖRLERİ

Tüm kemokin reseptörleri membran bağımlı moleküller olup yapılarında 7-transmembran domainleri bulunmaktadır ve G-proteinleri ile çiftler oluşturmaktadır. Kemokin reseptörleri, “G-protein-coupled proteinler” olup lökositler üzerinde eksprese olmaktadır. Kemokinler, hedef hücreler üzerindeki spesifik G-protein-coupled hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak hücre-içi sinyali başlatırlar ve hücre migrasyonu ile aktivasyonunu indüklemektedirler. Bu güne kadar 20 kadar kemokin reseptörü tanımlanmıştır (2). Kemokin reseptörleri ligand ilişkisi tablo 2. 3’de gösterilmiştir.

Tablo2.3. Kemokin reseptör-ligand ilişkisi

| RESEPTÖR | LIGANT |
|--------------|--|
| CXC Reseptör | |
| CXCR1 | IL-8 |
| CXCR2 | IL-8, GRO- α , GRO- β , GRO- γ , NAP-2, ENA-78 |
| CXCR3 | IP-10, MIG |
| CXCR4 | SDF-1 α |
| CC Reseptör | |
| CCR1 | MIP-1 α , RANTES, MCP-3 |
| CCR2 | MCP-1, MCP-3, MCP-5 |
| CCR3 | Eotaksin, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4 |
| CCR4 | MIP-1 α , RANTES, MCP-1, TARC |
| CCR5 | MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES |
| CCR6 | MIP-3 α / LARC |
| CCR7 | MIP-3 β / ELC |

Rollins BJ. Chemokines. Blood 1997;90:909-928

Kemokinlerin aracılık ettikleri hücre göçü ve aktivasyonu için bu moleküllerin hücre üzerindeki özgül reseptörlerine bağlanmaları gerekir. Bugüne kadar 4 tane CXC (CXCR1-CXCR4), 8 tane CC (CCR1- CCR8) ve 1 adet de CX3C (CX3CR) kemokin reseptörü

tanımlanmıştır. Bazı reseptörler tek bir hücrede yoğunlaşmışken (CXCR1 sıklıkla nötrofilde); diğer reseptörler farklı hücrelerde görülürler (CCR2 monosit, T lenfosit, NK hücre, dendritik hücre ve bazofilde). CCR1 ve CCR2 özellikle monositlerde bulunurken; sadece IL-2 uyarımından sonra lenfositlerde belirir (2,52).

Bazı kemokin reseptörleri çeşitli uyarılarla hücre yüzeyinde artış gösterebilirler. Örneğin CCR2 kemokin reseptörleri lipopolisakkaritlerin varlığında azalır ve böylece hücreleri sadece bu reseptörü aktive eden MCP-1'e karşı cevapsız kılar fakat CCR1 ve CCR5'i aktive eden MIP-1a'ya karşı hücrenin halen cevabı vardır (2,53).

Buna karşın diğer kemokin reseptörlerinin ortaya çıkışı farklı hücre tiplerinin ayrılmasından ve aktivasyonundan sorumludur. Örneğin; CXCR3 aktive yardımcı T lenfosit tip 1 (Th1) lenfositlerinde görülürken, CCR3, eozinofil, bazofil ve aktive Th2 lenfositlerinde görülür. Kemokin reseptörlerinin lökositlerde artışı hücre aracılı Th1 tip immün cevabı ile ya da allerjik Th2 tip cevabın özgül artışı ile olur (1,2,54).

Birçok kemokin reseptörü birden fazla kemokinle bağlanmakta ise de; CC reseptörleri sadece CC kemokinleri, CXC reseptörleri de CXC kemokinlerini bağlamaktadır. Bu reseptör-ligand sınırlılığı muhtemelen primer, sekonder ve tersiyer yapıları benzer ancak kuaterner yapıları birbirinden farklı olan CC ve CXC kemokinlerin yapısal farklılığından kaynaklanmaktadır (1,2,3,55).

Bazı kemokin reseptörleri de nöronlar, astrositler, epitelyal hücreler ve endotelyal hücreler gibi non-hematopoitik hücreler üzerinde eksprese olmaktadır. Bu bilgiler kemokin sisteminin lökosit kemotaksisi dışında diğer önemli görevlerinin de bulunduğunu göstermektedir (1).

Kemokin reseptörleri, "G-protein-coupled reseptör" ailesinin diğer üyeleri gibi fonksiyonel olarak fosfolipazlarla G-proteinlerine bağlıdır. Bazı kemokinlerin indüklenmiş sinyal olayları, Bordetella pertussis toksini ile inhibe olmakta, kemokin reseptörlerinin G proteinleri ile ilişkisini kanıtlamaktadır. Reseptör aktivasyonu hücresel aktivasyon sinyallerinin bağlamasına yol açmakta, intrasellüler kalsiyumun açığa çıkmasına ve sonunda proteinkinaz C'nin aktivasyonuna sebep olmaktadır (2).

Kemokin reseptör sinyali ayrıca, Ras ve Rho ailelerinin bazı küçük moleküler ağırlıklı guanozin-trifosfat bağlanma proteinlerini de aktive etmektedir. Rho proteinleri, aktin bağımlı süreçlerin düzenlenmesinde, hücre hareketlerinin sağlanmasında ve psödopod formasyonunun oluşumunda görev almaktadır. Kemokinler ayrıca 2 tip sinyal yaratmayan moleküllerle de interaksiyona girmektedirler. Bunlardan birincisi, eritrosit kemokin reseptör ve DARC (Duffy

antigen receptor for kemokin) olarak bilinmektedir. ikinci tip ise heparin sülfat proteoglikan grubu moleküllerdir (1-3).

2.9.3. Kemokin Üretimi ve Etkileri

Kemokinler genellikle lokal olarak salınan ve etki eden maddelerdir. Çoğu organda bazal kemokin üretimi düşük olup, m-RNA düzeyi, total hücresel RNA düzeyinin %1'ini aştığı durumlarda hızla ortaya çıkar. İskemik, toksik veya inflamatuvar lezyonlarda kemokin sekresyonu belirgin olarak artar. Kemokinler için en önemli uyaranlar şunlardır:

- IL-1p, TNF (Tumor necrosis factor-a)
- Lipopolisakkaritler
- Bazı büyüme faktörleri (PDGF: platelet derived growth factor)
- Viral enfeksiyon ajanları
- Bakteriyel ürünler

IFN-a, IL-4, Th-1 ve Th-2 lenfositlerden salgılanan sitokinler belirli bir sıra ile kemokin üretimini arttırmalar, öncelikle IL-1 ve ardından TNF-a hücrelerden kemokin salgılanmasını sağlarlar. Bunun yanında kemokin üretiminin inhibisyonu; TGF-B (transforming growth factor), IL-4 ve IL-10 gibi sitokinler ile olur; ancak bu etkileşim kemokine ve hücreye göre değişiklik gösterir. Kemokin aktivasyonunun önlenmesi kronik inflamatuvar cevap sırasındaki kemokine karşı oluşan yüksek afiniteli antikorların üretimi ile olmaktadır (1).

Kandan dokuya lökosit geçişi selektinler, integrinler ve kemokinler tarafından düzenlenen bir seri olay sonucunda gerçekleşir. Sitokinler; lökosit havuzunu ve adezyon moleküllerini artırarak lökositlerin kemokine olan cevabının artmasına neden olurlar. Bu bir dizi olay inflamasyonun özgülüğünü sağlar (1).

2.9.4. Kemokinlerin İnflamasyondaki Rolü

Pek çok akut ve kronik inflamatuvar hastalıkta kemokinlerin ortama salgılandığı gösterilmiştir. Bu hastalıklarda kemokinler dokuda lökositlerin birikmesini ve aktivasyonunu sağlar gibi görünmektedir (1-4).

Bakteriyel pnömoni ve erişkin respiratuvar distress sendromu gibi çoğu akut hastalıkta dokuda

aşırı nötrofil birikimi ve bu hastaların bronkoalveoler lavajından (BAL) alınan örneklerde de IL-8 gibi güçlü nötrofil uyarıcı yoğunluğunun artmış olduğu görülmüştür (1).

Lenfosit ve makrofajlar ile doku infiltrasyonu bir çok kronik olayda görülür. Tüberküloz, lepra ve sarkoidoz gibi granülamatöz lezyonlarda, aktive lenfosit birikimi karakteristik olup, IP-10 tesbit edilir ve aktive sarkoidozlu hastaların BAL'larında IP-10 konsantrasyonu aktive T lenfositlerin sayısı ile uyumludur (1,2).

Astım, rinit ve atopik dermatitte eozinofil, bazofil, T hücre, mast hücrelerinin birikimi ve aktivasyonu olur . Kemokinlerden özellikle eotaksin ve MCP, antijen ve Ig G yokluğunda esas histamin salgılatıcı faktör olarak rol alırlar . Bunun yanında MIP-1a ve RANTES (Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) de bu patofizyolojide rol alır. Birçok kemokin astmalı hastaların hava yolundan tesbit edilmiştir. Ayrıca eozinofillere etki eden çeşitli kemokinler atopik dermatit ve allerjik rinitte dokuda artmış olarak bulunmuştur, bu kemokinler antijen özgül immün aktivasyon ve dokuya eozinofil göçü arasında bağlantı sağlar gibi görünmektedir (56).

Gastrointestinal hastalıklardan ülseratif kolit ve Crohn hastalığının kronik döneminde makrofaj ve lenfositler bağırsağı infiltre ederken, akut dönemde nötrofiller ve muhtemelen de eozinofiller dolaşımdan intestinal mukozaya girerler. Bu hastaların intestinal mukozasında MCP-1, MIP-1 α , eotaksin, IP-10, IL-8 artmış olarak bulunmuştur. Ayrıca pankreatit oluşumunda erken dönemde etki eden bazı kemokinlerin varlığından da günümüzde bahsedilmektedir. Kronik pankreatitte ENA-78 (Epitelial nötrofil activating factor-78) ve IL-8'in ekzokrin dokuda arttığı, buna rağmen IP-10, MIP-1 α , MCP-1'in azaldığı görülür. Kronik hepatitte de hepatositlerin ölümü ve/veya mononükleer hücrelerin birikiminde IP-10 önemli bir rol oynar (57,58).

Deri hastalıklarından olan psoriaziste lezyonlar nötrofil, aktive T hücre içerir ve nötrofil uyarıcısı olan IL-8 ve GRO- α içerir. Aktive T hücre uyarıcısı olan; IP-10 ve MCP-1 normal deride olmamasına rağmen, psöriaziste bulunur ve tedavi ile IP-10 düzeyi azalır (1).

Yapılan insan ve hayvan çalışmaları sonucunda görülmüştür ki; Romatoid Artrit (RA) gibi kronik eklem hastalıklarında sinoviyal fibroblastlar ve doku makrofajlarından MCP-1 ve MIP-1 α salgınlamakta olup hastalığın patogenezinde rol almaktadırlar (56).

Böbrek hastalıklarından proliferatif glomerülonefritte glomerüllerin histokimyasal incelemesinde MCP-1 kemo-kini bulunmuştur. Benzer olarak IgA nefropatisi, membranoproliferatif glomerülonefrit ve krioglobülinemide glomerül ve tubulointerstisyumda

RANTES, MCP-1, IL-8'in varlığı saptanmıştır. Glomerülonefritlerde üriner IL-8 ve MCP-1 atılımı ve lökosit infiltrasyonu arasında pozitif bir ilişki bildirilmiştir. Böbrek transplant rejeksiyonunda da RANTES, IL-8, MCP-1 ve ENA-78 seviyeleri artmış olarak bulunmuştur . Ayrıca kemokin artışı iskemi, hidronefroz, diabetik nefropatiye bağlı renovasküler hipertansiyonda artmış olarak bulunmuştur (1-3).

2.10. KEMOKİNLER VE KRONİK HEPATİT C

İnsanlarda akut HCV enfeksiyonunun çalışılmasının zor olduğu ve HCV hastalığının tüm gidişatını tatmin edici şekilde açıklayan güvenilir bir hayvan modeli olmadığı gibi, HCV enfeksiyonunda inflamasyon ve kemokinler konusundaki verilerin çoğunluğu kronik faza sınırlıdır. Akut HCV enfeksiyonunda kemokinlerin ve hepatik inflamasyonun rolü hakkındaki sınırlı veriler bir şempanze modeli kullanılarak üretilmiştir. Non-ELR-CXC kemokinlerden intrahepatik IP-10 ve Mig transkriptlerinin akut olarak enfekte edilen şempanzelerde dramatik olarak arttığı gösterilmiştir(59).

CC kemokinlerden intrahepatik MIP-1 α mRNA seviyelerinin, HCV nin spontan olarak gerilediği akut enfekte şempanzelerdeki artışı bu kemokinin koruyucu bir rolü olduğunu düşündürmektedir (60).

İnflamasyonun, HCV gibi bir enfeksiyonun akut veya kronik fazı sırasında oluşmasına bağlı olmak üzere belirgin olarak farklı rolleri vardır. Kemokinler, inflamatuvar hücrelerin kemotaksisi aracılığıyla hastalığın seyrini etkileyebilir. Akut faz sırasındaki spontan HCV klerensi çoklu viral epitoplara karşı güçlü CD4 ve CD8 T-hücre cevabıyla ilişkilidir. Bu efektör T hücrelerinin karaciğere kemotaksisinden sorumlu olan kemokinler akut faz sırasındaki viral rezolüsyon için muhtemelen önemlidir. Fakat aynı kemokinler kronik faz sırasında, inflamatuvar hücreleri karaciğere yönlendirerek potansiyel olarak fibrozis/siroz'a ilerleyen kronik hepatite neden olan karaciğer hücre hasarını devam ettirebilir. Bu nedenle HCV enfeksiyonunun akut ve kronik fazları sırasında da aynı kemokinlerin ekspresyonunun çok farklı sonuçlar olabilir. HCV enfeksiyonuna özgü olmayan bu olay, mouse hepatitis virus (MHV) tarafından uyarılmış fare (murin) enfeksiyonu gibi hayvan modellerinde çalışılmıştır(61).

İntraserebral MHV enfeksiyonu, merkezi sinir sistemi içerisine güçlü T lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu ile karakterize bir akut ensefalomyelit ile sonuçlanır. Santral sinir sistemindeki bir enfeksiyonunun sonucu olarak çeşitli kemokinler uyarılır. Akut faz sırasında

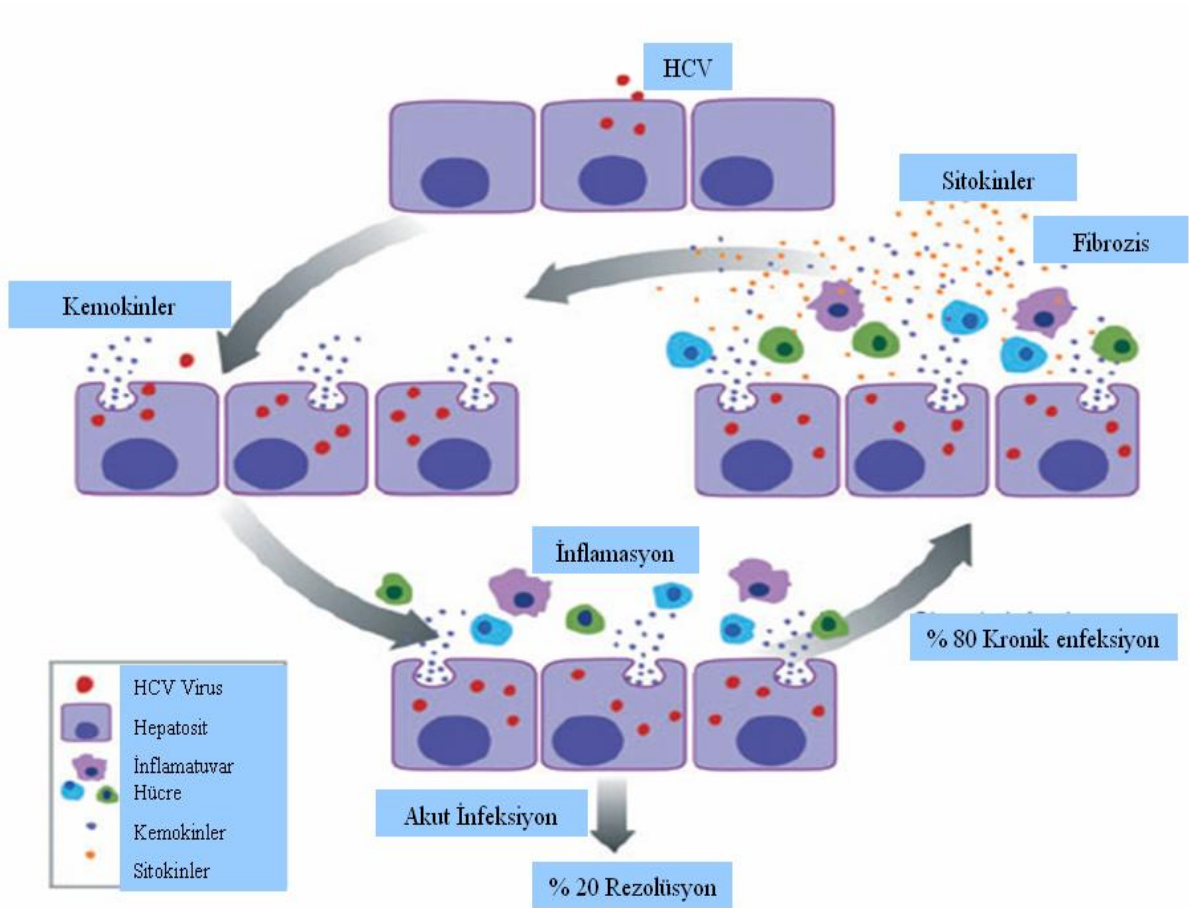
IP-10 ve Mig efektör T hücrelerini santral sinir sistemine çekerek viral klerens sağlar. Aksine, enfeksiyonun kronik fazı sırasında IP-10 ve RANTES inflamatuvar hücreleri virüslerin kalıcı olduğu bölgelere çekerek miyelin destrüksiyonuna neden olur (3).

Akut fazda HCV replikasyonunun baskılanamaması, enfeksiyonun kronik Fazı sırasında baskın olarak Th1-spesifik inflamatuvar hücrelerin devamlı olarak karaciğere toplanmasıyla sonuçlanan sık sık artan intrahepatik kemokin üretimine neden olur (3).

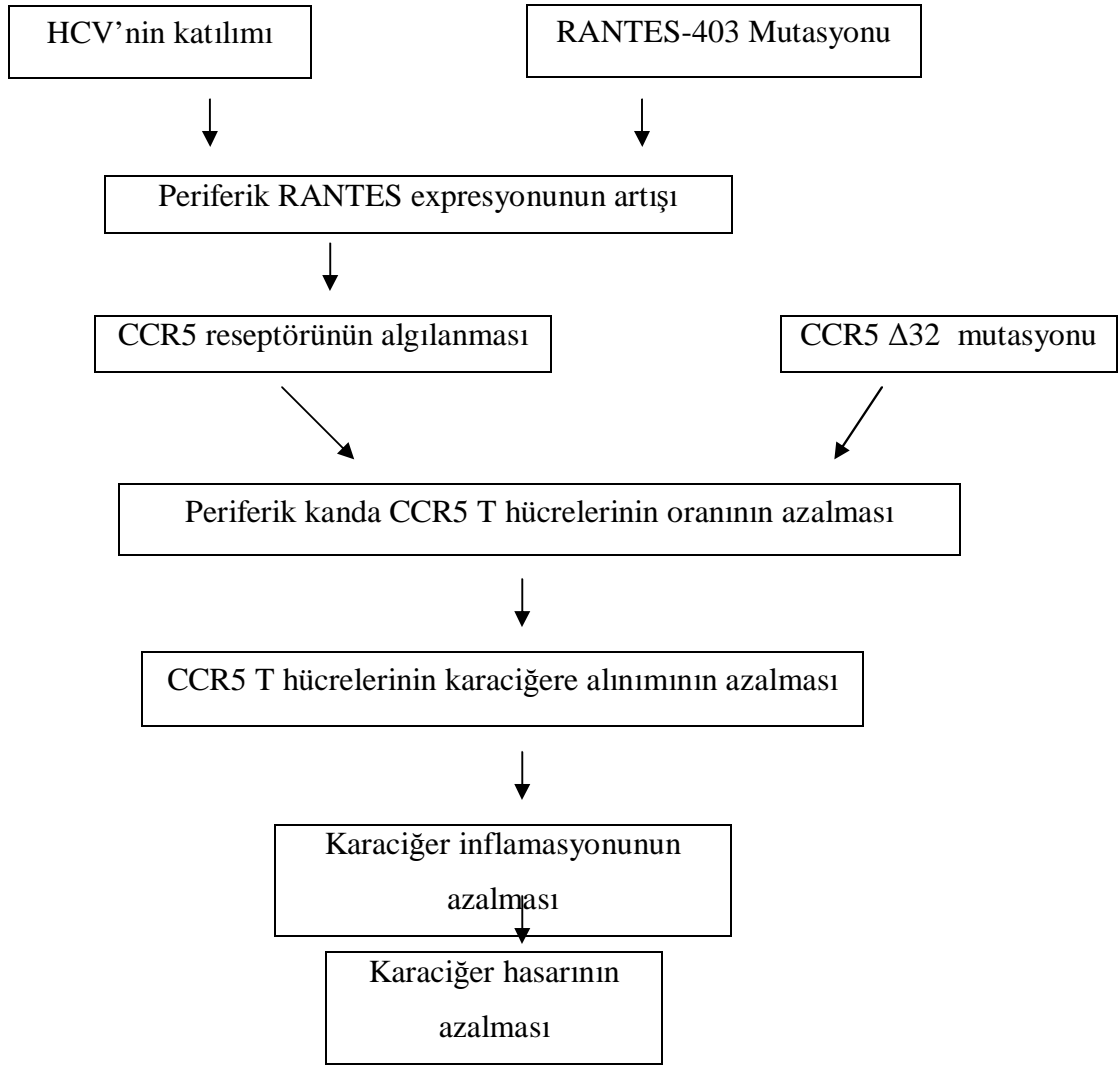
Kronik HCV enfeksiyonundaki hepatik inflamasyonla korelasyon göstermesi bu kemokinlerin kronik karaciğer hastalığı gelişiminde bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Kemokinlerin non spesifik kemoatraktan olmalarıyla birlikte kronik HCV hastalarındaki inflamatuvar hücrelerin de farklı antijenik özgüllükleri ve fonksiyonel kapasiteleri vardır. Bu hastalardan izole edilen intrahepatik T hücrelerinin çoğunun, IFN- γ üretmedeki ve aynı türden antijen sunan hücreleri proliferetme veya öldürmedeki yetilerinin sınırlı olduğu kanıtlanarak fonksiyonel olarak defektif oldukları görülmüştür. Viral klerenste etkili olmamalarına rağmen bu inflamatuvar hücreler kemokin ve sitokinleri tek başlarına üretebilirler. Primer olarak TGF (Tumor Growth Factor)- β olmak üzere bu sitokinlerin bazıları fibrogenezin başlatılması ve devam ettirilmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar(62).

Lökosit migrasyonundan sorumlu kemotaktik sitokinler olan kemokinlerin kronik HCV enfeksiyonunda periferel kan ve intrahepatik seviyelerinin artmasından dolayı inflamasyon gelişiminde bir rol oynadıkları düşünülmektedir. Kronik HCV enfeksiyonu sırasında karaciğerdeki baskın hücreler Th-1 hücreleri olduğu için, Th-1 leri kendine çeken kemokinler karaciğer hücre hasarı ve intrahepatik inflamasyon gelişiminde özellikle önemli olabilirler (3).

Sonuç olarak, kemokinler viral klerense neden olabilen inflamatuvar sürecin başlangıcında önemli önemli komponentler olabilmekle kalmayıp aynı zamanda uzun dönemde kronik karaciğer hastalığıyla sonuçlanan kronik inflamasyonun sürdürülmesinde de önemli bir rol oynayabilirler. Kronik hepatit C de oluşan karaciğer hasarında kemokin ve kemokin reseptörlerinin potansiyel rolü şekil 2.1 ve 2.2 de gösterilmiştir (3).



Şekil 2.1. İnflamatuvar döngü. HCV enfeksiyonu, güçlü bir bağışıklık yanıtı ve karaciğer parankimine HCV spesifik efektör hücrelerinin toplanması, HCV'nin spontan iyileşmesine aracılık eder. Kronik enfeksiyon süresince hepatositler içindeki inatçı HCV replikasyonu, inflamatuvar hücrelerin sürekli toplanmasını sağlayan kemokin üretilmesine yol açar. Kemokinler ve sitokinlerin üretimi süresince bu inflamatuvar hücreler siklusu sürdürürler. HCV replikasyon döngüsü, kemokin ve sitokin üretimi ve inflamatuvar hücrelerinin toplanması inflamatuvar döngüyü oluşturur.



Şekil 2.2. Kronik hepatit C de oluşan karaciğer hasarında kemokin ve kemokin reseptörlerinin potansiyel rolü

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul tarafından onaylanmıştır.(onay no:26/04/2009 09/58).

Çalışma, Eylül 2008 –Eylül 2009 tarihleri arasında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji B.D’da yapıldı. Genetik analiz Genetik A.D’da, histopatolojik inceleme Patoloji A.D’da yapıldı. Çalışmada, kronik hepatit C tanısı almış 25 erkek ve 33 bayandan oluşan 58 hasta; 41 erkek ve 17 bayandan oluşan 58 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu yer aldı.

Çalışmada iki grup CCR5 geninde 32 baz p delesyon (32bp del) sıklığı açısından karşılaştırılırken, hasta grubunda mutasyon saptanan ve saptanmayan iki grup oluşturuldu. Bu iki grupta, mutasyonun karaciğerdeki histopatolojik bulgular, fonksiyon testleri ve virolojik parametrelerle ilişkisi karşılaştırıldı. Aynı zamanda KHC hastalarının karaciğer biyopsi materyallerinde CCR5 gen ekspresyonu araştırılarak ekspresyonun karaciğer histopatolojik bulgularla ilişkisi incelendi.

Hastaların seçimi ve örneklerin toplanması

ELİSA yöntemi ile belirlenmiş HCV antikoru pozitif ve PCR yöntemi ile belirlenen anlamlı HCV RNA düzeyi (>50 IU/ml) olan hastalar çalışmada yer aldı. Bu hastalar hiç tedavi almamış naif hastalar olup, HAV, HBV, HDV ve HIV açıdan seronegatif. Hastaların alkol ve toksik ajan kullanım öyküleri yoktu. Otoimmün hepatit ekarte edilmişti.Kronik HCV hastalığı dışında kronik yada sistemik hastalığı yoktu.

Çalışmaya dahil edilen hastaların 21’i tesadüfen tespit edilmişken; 37 hastanın bilinen seropozitif öyküsü 6-36 ay (ort:23.9±12.8) şeklindeydi. Hasta ve kontrol grubundan onay alınarak periferik kan örnekleri 1 ml EDTA içeren tüplerde biriktirilerek -20 C’de toplandı.

Gastroenteroloji Kliniği’de biyopsi endikasyonu konulan bu hasta grubundan onay alınarak karaciğer biyopsileri yapıldı. Biyopsi materyalleri Patoloji A.D’da incelendi. Değerlendirme, Modifiye Histolojik Aktivite İndeksi (ISHAC) skorlamasına göre histolojik aktivite indekleri (HAİ) ve fibrosis düzeyleri belirlendi.

3.1. GENETİK ANALİZ

Kullanılan cihaz ve kimyasallar

- 1) hibridizasyon cihazı (profiblot T48,Tecan)
- 2) Thermal Cycler (Applied Biosystems,2720)
- 3) kuru ısı bloğu (CHB-202,Bioer)
- 4) Santrifüj(micro 120,Heltich)
- 5) 1000'lik,200'lük ve 10'luk mikropipetler(Eppendorf ve gilson)
- 6) DNA izolasyon kiti (Invitex,,Invisorb spin Blood Kit)
- 7) PGX-HIV Strip Assay PCR ve hibridizasyon kiti (Vienna Lab)
- 8) Elektroforez (Biorad,midi)
- 9) Güçkaynağı (Biorad,.....)
- 10) Taq DNA polimeraz (fermentas)
- 11) Ethidium Bromide (EtBr)
- 12) TAE tamponu (Applichem)
- 13) Agaroz(Nu micropor,Prona)
- 14) Otoklav indikatörü
- 15) Tüp (K3-EDTA,Vacurette)
- 16) Eppendorf tüp (1.5,2 ve 0.2 ml,Sarstedt)

17) Micropipet uçları (beyaz,sarı ve mavi,Biosphere Fitler Tips)

18) Etil alkol (Merck)

19) Yükleme boyası (Fermentas)

DNA İzolasyonu

Bütün hastalardan genomik DNA izolasyonu periferik kan dokusundan yapıldı.Bunun için Invisorb Spin Blood DNA İzolasyon kiti kullanıldı.Yaklaşık 200ul periferik kan dokusunun kullanıldığı teknik sonrasında 30-50 ng/ μ l ultrapür DNA izole edilmektedir.(A260:A280 oranı 1,7-2 arası).İzolasyon için kullanılan kit içeriği aşağıdaki gibidir;

- 1) proteinaz K, 1ml (10ug/ μ l)
- 2) Lysis Buffer A,15ml
- 3) Binding Buffer B6,30ml
- 4) Eluotion Buffer D,15ml
- 5) Yıkama tamponu I,30ml (kullanmadan önce 30 ml %100'lük etil alkol eklenir.)
- 6) Yıkama tamponu II,18ml (kullanmadan önce 42ml %100'lük etil alkol eklenir.)
- 7) 2.0ml'lik toplama tüpleri ,100 adet
- 8) 1.5ml'lik toplama tüpleri
- 9) Filtreler

Kan Dokusundan DNA İzolasyonu Protokolü

Çalışmadan önce örnek sayısına yetecek kadar eluotion buffer D 56°C'ye ısıtıldı.Kodlaması yapıldıktan sonra 1,5'luk ependorf tüpe 200ul EDTA'lı kan,200ul lysis buffer A ve 20 ul proteinaz K konuldu.Kapağı kapatılarak tüp 10 sn vortekslenildi ve 56°C'de 10dk inkübasyona bırakıldı.İnkübasyon sonrası tüp ortamında 400ul binding buffer B6 tüpe eklendi,3-4 kez pipetaj yapıldıktan sonra lizatın tamamı filtrelili toplama tüpüne aktarıldı.Filtre topla tüpü daha sonra 3dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 12 000rpm'de 2dk santrifüj edildi.

Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı,üzerine 500ul wash buffer I eklendi ve 12000rpm'de 2 dk santrifüj edildi.Filtre üzerine 800ul wash buffer II eklenerek ve 12 000rpm'de 1dk santrifüj edildi.Filtre üçüncü kez olarak 2ml'lik yeni bir toplama tüpüne aktarıldı,14 000rpm'de 5dk santrifüj edilerek yıkama tamponlarından gelen alkolden arındırıldı.Alkolden tamamen arındırmak için Filtre dördüncü ve son kez yeni 1,5 'luk tüpe yerleştirildi ve 3dk kapağı açık biçimde oda sıcaklığında bekletildi.

Daha sonra Filtre membranının tam ortasında 200µl eluotion buffer-D eklendi,5dk oda sıcaklığında inkübe edildi.Filtrelili tüp 10.000rpm'de 1 dk santrifüj edildi,filtredeki DNA çözültüsü tüpe toplama tüpüne aktarıldı,etiketlendi ve -20°C'de çalışmak üzere muhafaza edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

CCR5 geninin amplifikasyon için Vienna Lab PGX-HIV PCR amplifikasyon kiti kullanıldı.Kit bir amplifikasyon karışımı (CCR5 gen bölgesine ait biyotin işaretli primerler,ve diğer amplifikasyon için gerekli bileşenleri içerir)ve taq DNA polimeraz tamponundan oluşmaktadır.

PCR mastermiks,her hasta için etiketlenmiş 0.2 ml ependorf tüp ortamı;

Amplifikasyon karışımı : 15µl

Taq DNA polimeraz seyreltici tapon : 4,6µl

Taq DNA polimeraz : 0,4µl

Kalıp DNA : 5µl

Toplam hacim : 25µl şeklinde hazırlandı.

Multipleks PCR koşulları aşağıdaki gibi ayarlandı:

95°C 'de.....2dk (ilk denaturasyon)

95°C'de.....15sn (denaturasyon)

56°C'de30 sn (bağlanma)

72°C'de.....30 sn (uzama)

72°C'de.....3dk (son uzama)

Elde edilen PCR ürünleri strip test tekniğinde değerlendirilmek üzere +4°C'de saklandı.

Agaroz Jel Elektroforezi

Hibridizasyon işleminden önce elde edilen PCR ürünleri (4 µl) öncelikle %1'lik elektroforezde başarılı amplifikasyonlar açısından değerlendirildi. Başarılı amplifikasyon elde edilen PCR ürünlerinden 10 µl ürün Souther Blot analiz için kullanıldı.

Revers-Hibridizasyon (Southern Blot)

Southern Blot analiz için Revers-hibridizasyon ProfiBlot T48 (Tecan)hibridizasyon cihazı kullanıldı.Revers-hibridizasyon,biyotin işaretli primerler çoklu (multiplex)polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında oluşan ürünlerin nitroselluloz membranlar (stipler)üzerindeki kendi komplementer zincirlerine bağlanması ve bir konjugat-substrat reaksiyonu oluşturması esasın dayanan bir tekniktir.

Revers Hibridizasyon basamakları ve kullanılan solüsyonlar

Strip test tekniğinde Revers Hibirdizayon 3 temel basamaktan ibarettir;

1)Srip üzerindeki proplar ve PCR ürünlerinin bağlanması-hibridizasyon

Cihazın örnek yükleme bölgesinde (trey) yüklenen 10µl PCR ürünü kitle birlikte sağlanan 10µl DNAT (NaOH içerikli bir denatürasyon solüyonu)solüyonu kullanılarak denatüre edildi.Treye strip yerleştirildi.Denatüre PCR ürünü ve strip,cihazın sallanan platformunda,45°C de sıcaklıkta (yaklaşık)1 ml hibridizasyon tamponu ile 20 dk inkübe edilerek strip PCR ürünü hibridizasyonu sağladı.Hibriidzasyon solüsyonu aspire edilerek ortamdaki uzaklaştırıldı.

2) Yıkama

Hibridizasyon sonrasında ortamda bulunması istenmeyen PCR ürünleri ve nonspesifik bağlanma yapan oligonükleotidler kuvvetli bir yıkayıcı olan yıkama solüsyonu A (1ml) ile 45°C’de 15dakikalık üç yıkama preiyodu ile ortamdaki uzaklaştırıldı.

3) Renk Oluşumu

Stripler oda sıcaklığında 1ml konjugat solüsyonu ile 15dk inkübe edilerek konjugat solüsyonu içinde bulunan streptavidin-alkalan fosfataz, biyotin işaretli hibrit DNA fragmentlerine bağlanması sağlandı.

Konjuat solüsyonunun artıkları daha yumuşak bir yıkama solüsyonu olan yıkama solüsyonu B ile 10,5 ve 5 dakikalık üçer periyotta temizlenirdi.Strip üzerindeki hibridize olmuş bantların görülür hale gelebilmesi için ortalama 1 ml alkalan fosfatazın substratı olan nitro blue tetrazolium (NBT) ve 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfatdan (BCIP) oluşan renk geliştiricisi (color developer)eklendi,oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona tabi tutuldu Strip son olarak distile su ile yıkandı,kağıt havlu ile özenle kurutulduktan sonra değerlendirme tablosuna (Collector)özenle yerleştirildi.

STRİPLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Her stripin üst tarafında kırmızı ve alt tarafında yeşil bir belirteç bulunmaktadır. Bunun dışında hibirdizasyon sonrası stiplerin değerlendirmeye alınabilmesi için kontrol bantının oluşmuş olması gerekmektedir. Kontrol bantları oluşmamış stripler değerlendirilmeye alınmadı.

Yabanıl tip gen bölgelerine ait prob stripin alt kısmına, mutant gen bölgelerine ait prob ise stripin üst kısmında sinyal verecek şekilde dizayn edilmişlerdir. Hibirdizasyon sonrası yabanıl tip bantların mevcut olduğu ve mutant gen bölgelerine ait bantların bulunmadığı bir strip profili hastanın mutasyona sahip olmadığını gösterir. Mutant gen bölgelerinde ait bantlardan sinyal alınıyorsa sinyal alınan mutasyonun yabanıl tip kodonuna bakılarak saptanan mutasyonun homozigot ya da heterozigot olma durumuna karar verilir. Mutasyonun yabanıl tip gen bölgesini gösteren bantın mevcut olması mutasyon heterozigot, mevcut olmaması durumunda ise homozigot olarak değerlendirilir (resim 1).

3.2. Histopatolojik Ve İmmünohistokimyasal Çalışma Yöntemi

50 hastaya ait HE boyalı karaciğer preparatları tekrar incelendi ve paraffin bu prepatratlara ait parafin bloklardan adezivli lamlara immünohistokimyasal boyama için 3-5 µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Olgulara immünohistokimyasal olarak CCR5 (Goat Polyclonal anti-CCR5, NB100-714) boyası uygulanarak CCR5 in kronik Hepatit C enfeksiyonu olan karaciğer kesitlerindeki immünohistokimyasal ekspresyonlarına bakıldı. Yöntem olarak Avidin-Biyotin-Peroksidaz (ABP) yöntemi uygulandı.

Boyama Yöntemi

1. Boyama işlemi nemlendirilmiş, ısı 24 C'ye kadar çıkarılmış, ıslak zeminli zeminli bir ortamda uygulandı. Formalinle fikse edilen ve parafine gömülü bloklardan 3-5 µm kalınlığında hazırlanan doku kesitleri önce 65 C'de 1 saat etüvde tutulup bir gece oda ısısında bekledikten sonra 50 C'de 30 dakika süreyle ksilende deparafinize edildi

2. Bu işlemden sonra dokular sırayla 5'er dakika 80, 90, 96 derecelik alkollerden geçirilerek dehydrate edildi.

3. Dokular dehidrasyon işleminden sonra sırasıyla distile suda ve PBS (Phosphate Buffer Saline) solüsyonunda 5'er dakika yıkandıktan sonra antijen geri kazanımı için %3'lük H₂O₂ solüsyonunda 5 dakika bekletildi.

4. 10 dakika PBS solüsyonunda tutulduktan sonra dokudaki antijen geri kazanımını etkinleştirmek için tüm antikorlarla boyanacak kesitler mikrodalga fırında pH değeri 9 olan EDA Buffer içinde 40 dakika yüksek ısıda kaynatıldı. Sonrasında 20 dakika aynı solüsyon içerisinde oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

5. 10 dakika PBS solüsyonunda tutulduktan sonra preparatlara UV blok 20 dakika boyunca damlatılarak bekletildi.

6. Sonrasında kullanıma hazır CCR5 (Goat Polyclonal anti-CCR5, NB100-714) antikoruna ile oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyon yapıldı. Takiben 10 dakika PBS 'de tutuldu.

7. Bağlayıcı solüsyon ile 20 dakika oda ısısında inkübasyon yapıldı. Takiben 10 dakika PBS'de tutuldu.

8. Streptavidin-Peroksidaz ile 20 dakika oda ısısında inkübasyon yapıldı ve 10 dakika PBS'de tutuldu.

9. Son olarak substrat kromojen karışımı ile renklendirme işlemi yapıldı. Bunun için bir damla AEC kromojen ile 2 ml substrat tamponu karışımından oluşan dilüsyon ile hazırlanan solüsyon ile 10 dakika oda ısısında inkübasyon işlemi yapıldı.

10. Zıt boyama için bir dakika süreyle Mayer'in Hematoksileni'nin kullanıma hazır formu uygulandı. Takiben distile sudan geçirildi. Doku kurutuldu ve kapatma solüsyonu kullanılarak lamel ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi.

Histopatolojik ve immunohistokimyasal değerlendirmede; CCR5 pozitifliği portal alanda ve parankimdeki kuffer hücrelerinde ve lenfositlerde seyrek ve zayıf pozitiflik şeklinde izlendi (resim 2).

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızın verileri SPSS (Ver:14,0) programına yüklendi. Çalışmada elde edilen veriler ortalama, \pm standart sapma ve yüzde olarak verilmiştir. Hasta grubu ile kontrol grubu yaş ve cinsiyet yönünden karşılaştırılırken χ^2 testi, CCR5 polimorfizmi açısından karşılaştırılırken, Fisher's Exact Test kullanıldı. Mutasyonlu grup ile mutasyonsuz grup ekspresyon açısından karşılaştırılırken Fisher's Exact Test kullanıldı.

CCR5 mutasyonu ve doku ekspresyonunun karaciğer histopatolojik bulgularla arasındaki ilişki araştırılırken Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Hasta grubunda yaş ortalamaları 54.3 ± 10.5 olan 25 erkek (%43.1) ve 33 kadın (%56.9) yer aldı. Kontrol grubunda yaş ortalamaları 58.82 ± 11.6 olan 38 erkek (%65.5) ve 20 bayan (%34.5) olmak üzere toplam 58 hasta yer aldı. Gruplar arasında yaş uyumu açısından fark yok iken ($p > 0.05$), cinsiyet yönünden aradaki fark anlamlı idi ($p < 0.05$). Her iki grup mutasyon açısından karşılaştırıldığında hasta grubunda 5 hastada (%8.6) CCR5 heterozigot mutasyon saptanırken, kontrol grubunda 1 kişide (%1.7) mutasyon saptandı; iki grup arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p = 0.206$), (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Hasta grubu ile kontrol grubunun mutasyon açısından karşılaştırılması

Gen tipi

| CCR5 (32bpdel) | HCV | | Kontrol | |
|----------------------|-----|---------------------|---------|---------------------|
| | n | (%) | n | (%) |
| WT/WT (normal allel) | 53 | (91.4) | 57 | (98.3) |
| Heterozigot mutasyon | 5 | (8.6 [*]) | 1 | (1.7 [*]) |
| Homozigot mutasyon | - | - | - | - |
| Toplam | 58 | (100) | 58 | (100) |

* $p > 0.05$

Hasta grubunda, mutasyon saptanmayan hastalarda, yaş ortalamaları 54.4 ± 11.3 olan 26 erkek ve 27 bayan mevcuttu. mutasyon saptanan hastalar ise yaş ortalamaları 54.2 ± 7.8 olan 3 erkek ve 2 bayan şeklindeydi. Hasta gruplarının demografik ve klinik parametrelerini gösteren özellikler tablo 4.2 de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Hasta gruplarının demografik ve klinik özellikleri

| | WT/WT | WT/del |
|-----------------------|-----------------|----------------|
| HCV hasta | 53 | 5 |
| Cinsiyet (E/K) | 26/27 | 3/2 |
| Yaş ort (yıl) | 54.4 ± 11.3 | 54.2 ± 7.8 |
| Genotip | | |
| 1A | 3 | - |
| 1B | 35 | 3 |
| 2A | 3 | - |
| Belirlenemeyen | 12 | 2 |

Mutasyon saptanan hasta grubunda viral yük $6.4 \times 10^6 \pm 2.9 \times 10^5$ IU/ml şeklindeyken; mutasyon olmayan hasta grubunda $2.8 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^5$ IU/ml idi. İki grup arasında viral yük mutasyonlu hasta lehine istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksekti ($p=0,037$).

Mutasyon saptanan hasta grubunda HAI (4.0±1.0), saptanmayan hasta gruba (5.7±1.7) göre anlamlı derecede düşük tespit edildi ($p=0.022$). ALT düzeyleri ile mutasyon arasındaki ilişki incelendiğinde mutasyonlu grupta daha düşük değerler tespit edilirken (55.2±32.4; 65.6±38.5) aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p=0.582$).

Mutasyonun fibrozis düzeyleri ile ilişkisi incelendiğinde; mutasyon grubunda 1.6±1.3 şeklindeyken, mutasyon olmayan grupta 2.6±1.8 olarak tespit edildi. Fibrozis değeri mutasyonlu grupta daha düşüktü, ancak aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p=0.352$). Hasta gruplarının mutasyon, histopatolojik ve bazı laboratuvar değerler arasındaki ilişki tablo 4.3 da gösterilmiştir.

Tablo 4.3: hasta gruplarının histopatolojik ve laboratuvar bulgularla mutasyon arasındaki ilişki

| HCV hasta grubu | WT/WT | WT/del | P |
|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------|
| Viral yük (IU/ml) | $2.8 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^5$ | $6.4 \times 10^6 \pm 2.9 \times 10^5$ | 0,037 |
| HAI | 5.7 ±1.7 | 4.0±1.0 | 0.022 |
| FİBROZİS | 2.6±1.8 | 1.6±1.3 | 0.352 |
| ALT | 65.6±38.5 | 55.2±32.4 | 0.582 |

Çalışmaya dahil edilen hastaların karaciğer biyopsi materyallerinde yapılan immünohistokimyasal incelemede; 15'nde (%30) intrahepatik CCR5 ekspresyonu görüldü. Hastaların 30'nda (%70) ekspresyon izlenemedi. 8 hastada teknik nedenlerle inceleme yapılamadı.

Ekspresyon izlenen hasta grubunda HAI 6.1±2.3 şeklindeyken, izlenmeyen grupta 4.9±1.3 idi. Aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlıydı ($p=0.034$). Fibrozis düzeyleri ekspresyon izlenen grupta 2.1±2.1 şeklindeyken, izlenemeyen grupta 1.9±1.5 idi. Ekspresyon izlenemeyen grupta fibrozis düzeyi daha düşük idi, fakat aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p=0.625$). Tablo 4.4.

Tablo 4.4. CCR5 intrahepatik ekspresyonu ile karaciğer histopatolojik bulguları arasındaki ilişki

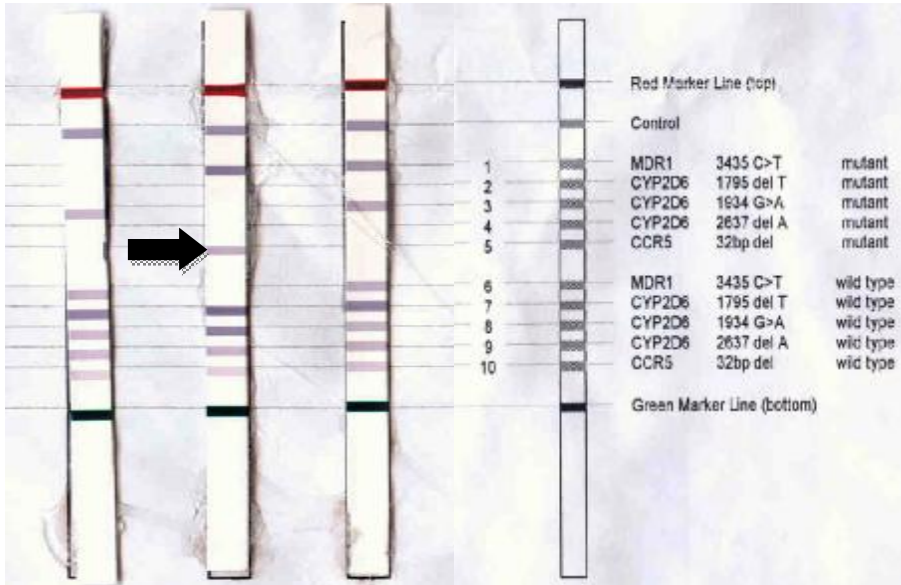
| | CCR5 Exp (+) | CCR5 Exp (-) | p |
|----------|--------------|--------------|-------|
| | n=15 (%30) | n=30 (%70) | |
| HAİ | 6.1±2.3 | 4.9±1.3 | 0.034 |
| FİBROZİS | 2.1±2.1 | 1.9±1.5 | 0.625 |

Hepatit C'li hastalardan mutasyon saptanmayan 45 hastanın 15'nde doku ekspresyonu izlenirken; mutasyon saptanan 5 hastanın hiç birinde ekspresyon yoktu. Aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi. (p=0.305). tablo 4.5

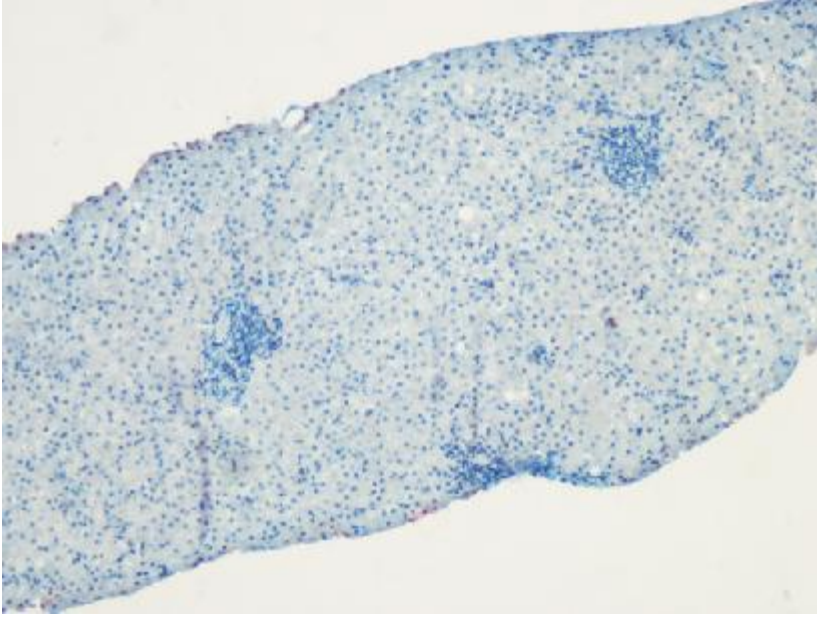
Tablo 4.5. HCV hastalarında mutasyon ile CCR5 doku ekspresyonu arasındaki ilişki

| Genotip | <u>N</u> | exp (+) | exp (-) |
|---------|----------|---------|---------|
| WT/WT | 45 | 15* | 30 |
| WT/del | 5 | 0* | 5 |
| Toplam | 50 | 15 | 35 |

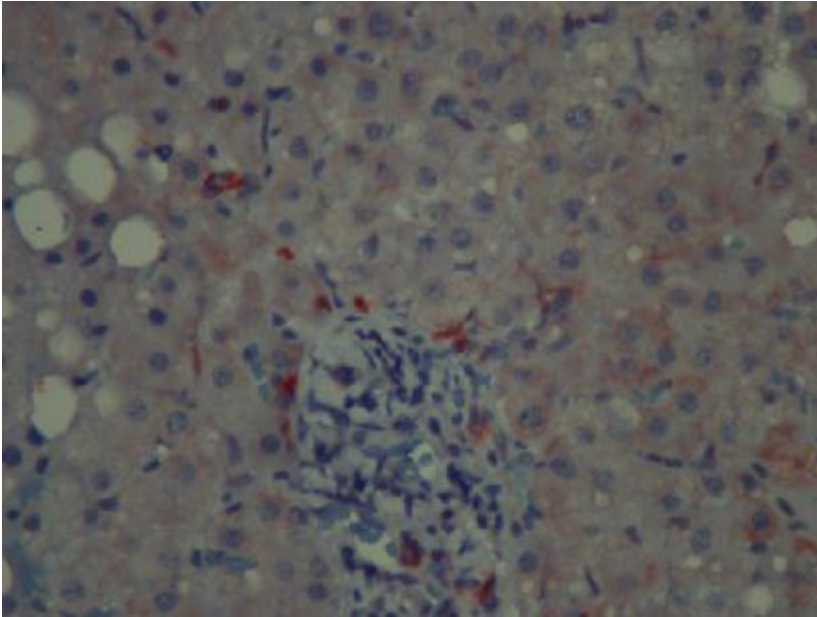
*p=0.305



Resim 4.1: StripAssay tekniği ile CCR5 heterozigot gen mutasyonu saptanması

**RESİM 4.2.**

Karaciğer parankim ve portal alanda CCR5 ile negatif boyanma (IHKx20)

**Resim 4.3.**

Kupfer hücresi ve Portal alanda seyrek lenfositlerde CCR5 ile pozitif boyanma (IHKx40)

5. TARTIŞMA

Hepatit C virüs, siroz ve/veya hepatoselüler karsinoma ilerleyebilen kronik karaciğer hastalığının önemli bir nedenidir. İntrahepatik inflamasyon ve karaciğer hücre hasarı kronik HCV enfeksiyonunun belirleyici özellikleridir. Lökositleri inflamatuvar bölgelere çeken kemotaktik sitokinler olan kemokinler intrahepatik inflamasyon gelişiminde önemli olabilirler.

CC subfamilyasından Th1 hücrelerle ilişkili olan kemokinler, aktivasyona göre düzenlenmiş, normal T hücresinden eksprese ve sekrete edilen kemokin (RANTES), ve makrofaj inflamatuvar protein(MIP)- 1 α ve β 'yı içerir. Bu kemokinler kendi reseptörleri olan CCR5 ile etkileşerek hücreleri çekerler. Bu kemokinlerin tamamının kronik hepatit C hastaları nda periferik kan ve intrahepatik seviyeleri yüksek iken, yalnızca seçili kemokinlerin hepatic inflamasyonla korele olduğu bulunmuştur (3).

Hepatit C virusu, dünya çapında 170 milyondan fazla enfekte kişiyle kronik karaciğer hastalığının başta gelen nedenidir. Virüse maruz kalan kişilerde çoğunlukla (%50-80) fibrozis, siroz ve/veya hepatoselüler karsinoma neden olan kronik hepatit gelişimiyle sonuçlanan kronik enfeksiyon gelişir. Ancak kronik inflamasyonun şiddeti ve hastalığın progresyon hızı oldukça değişkendir. Kronik hepatit C hastalarının (KHC) %20-33'u 20-30 yıllık süre içerisinde siroza ilerlerken geri kalanı progresyon göstermeyen veya çok yavaş ilerleyen ılımlı kronik hepatit hastalarıdır (63,64).

Akut faz sırasında doğal HCV eradikasyonu multipl epitoplara karşı güçlü CD4 ve CD8 yanıtını gerektirir. Virüse spesifik yanıt geliştirmekte yetersiz olan hastalar veya yanıtları zamanla azalma gösterenler kronik olarak HCV ile enfekte hale gelebilirler. Bu hastalarda interferon (IFN)- γ ve IL-2 sekresyonuyla karakterize T hepler(Th)-1 aracılı intrahepatik inflamasyon gelişimi ve inflamasyonun uzaması, varolan doku hasarı ve fibrojenesi kolaylaştırabilir. Ayrıca intrahepatik inflamasyon, progresif karaciğer hasarı gelişiminde direk viral sitotoksiteden daha önemli görünmektedir(65,66).

HCV ile enfekte kişilerde CXCR3 ve CCR5 eksprese eden intrahepatik T hücrelerinin oran periferik kandakine kıyasla artmıştır ve sağlıklı kişilerde CCR5 ekspresyonunda bu fark yoktur. Enfekte olmayan kişilerin aksine az miktarda intrahepatik T hücresi CXCR3 veya CCR5 pozitif olan kronik hepatit C(CHC) hastalar nda portal ve lobüler T hücrelerinin çoğunluğu bu iki kemokin reseptörünü eksprese eder(5,15).

Çeşitli çalışmalar kronik HCV enfeksiyonunda RANTES ekspresyonunu değerlendirmiş ve uyumsuz sonuçlar elde etmiştir. İntrahepatik RANTES ekspresyonu hepatositler, sinüzoidal endotel hücreleri ve biliyer epitelyum gibi çeşitli hücre tiplerinde gözlemlenmiştir. Tüm bu çalışmalar KHC hastalarında intrahepatik ekspresyonun enfekte olmayan kişilere göre yüksek olduğunu raporlamıştır(16,17).

HCV, RANTES üretimiyle etkileşerek anti-HCV immün cevaplarından kurtulabilir. İn vitro olarak hem tam büyüklükteki HCV hem de E2 zarf proteini RANTES ekspresyonunu pozitif yönde düzenleyebilir. Daha spesifik olarak, E2 zarf proteini ile tetraspanin(ailesinden) CD82 arasındaki bir etkileşimin primer olarak periferik kandaki CD8+ hücrelerde doz bağımlı RANTES salınımını, CCR5 yüzey ekspresyonunun negatif(down)- regülasyonunu ve bunun intraselüler akümülyasyonunu uyardığı görülmüştür(67).

RANTES sekresyonundaki ve CCR5 yüzey ekspresyonundaki değişiklikler karaciğere lenfosit göçünü etkileyebilir. Konağın RANTES ve CCR5 ile ilişkili genetik polimorfizmi de ayrıca HCV hastalarındaki azalmış portal inflamasyon ve daha ılımlı olan fibrozis ile ilişkilidir(10,12,69). Spesifik olarak, fonksiyonel CCR5 protein ekspresyonunu önleyen bir çerçeve kayma mutasyonu olan CCR5-Δ32 azalmış portal inflamasyonla ilişkilidir. Bu bulgular CCR5'in karaciğer inflamasyonuna potansiyel katkısını daha çok vurgulamaktadır.

CCR532bpdel CCR5 kemokin reseptörünün delesyon mutasyonudur. Bu mutasyon sonucunda dokuda ve periferik hücrelerde CCR5'in ekspresyonunda önemli azalma görülmektedir. Bu nedenle CCR5 genotipi tayini HCV enfeksiyonlarında CCR5'in rolünün değerlendirilmesinde kullanılabilir. Yakın zamandaki çalışmalarda CCR5 heterozigot mutasyonundan türetilmiş CD3 pozitif T hücreleri CCR5'in ekspresyonunu ve ligandlara cevabını azaltığı gösterilmiştir (9). Bu bulgular ışığında yapılan çalışmalarda CCR5 mutasyonu ve ekspresyonun karaciğer inflamasyonunun modülasyonunda rolü olabileceği bildirilmiştir(10). Woitas ve arkadaşları CCR5 mutasyon sıklığının HCV'li hastalarda normal popülasyondan daha yüksek olduğu ve bunun enfeksiyonun konak savunmasını etkilediğini bildirdiler (11). Buna karşın Promrat ve arkadaşları CCR5 mutasyonu ile HCV enfeksiyona yatkınlık ve sıklığı arasında korelasyon olmadığını bildirdiler (10).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda CCR5 mutasyonu ile HCV enfeksiyonu arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Bu çalışmalarda mutasyon saptanan hastalarda karaciğerdeki inflamasyonun ve fibrozis derecesinin daha düşük olduğu ve klinik seyrin daha yavaş olduğu bildirilmiştir (12-14).

Bu bilgiler ışığında; bu çalışmada kronik hepatit C hastalarında kemokin reseptörlerinden CCR5 gen mutasyonunun ve doku ekspresyonunun karaciğer histopatolojik bulgularına etkisi araştırıldı. Aynı zamanda KHC hastalarında bu gen mutasyonunun sıklığı sağlıklı bireylerle karşılaştırıldı.

Kronik hepatit C hastalarında bildirilen CCR5 gen polimorfizmi sıklığı genellikle %10-15 civarındadır. Normal popülasyonla karşılaştırıldığında HCV ile enfekte kişilerdeki bu oranın benzer bulunmuştur (10,12). Bu çalışmada, KHC hastalarında bu orana yakın değerler elde edildi (%8.6); fakat sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında çok daha düşük değerler saptandı (%1.7). Yeni çalışmalarda sıklık açısından fark olmadığı bildirilse de (14), bizim çalışmamızdaki veriler bunu desteklememektedir. Biz bu çalışmada HCV ile enfekte hastalarda mutasyon oranını daha yüksek bulduk. Gelecekte KHC hastalarında tedavi başarısının bu mutasyon sıklığı ile ilişkisi olup olmadığı araştırılabilir. Goulding ve arkadaşları CCR5 Delta heterozigot mutasyonu olan hastalarda HCV'nun spontan klerensinin mutasyonu olmayanlara göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (14). Bu sonuç tedavi başarısı ile ilişkili olabilir.

Kronik hepatit C hastalarında kemokin reseptörlerini ve CCR5 polimorfizmi ile klinik seyir, karaciğer histolojisi, seroloji ve laboratuvar bulguları arasındaki ilişkiyi araştırılan çok sayıda çalışma yapılmıştır (5,6,9-14).

Goulding ve arkadaşları CCR5 Delta heterozigot mutasyonu olan KHC hastalarda hepatik inflamatuvar skorunun çok düşük olduğu ve bu skorun mutasyonla çok yakın ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, heterozigot mutasyonun fibrozis düzeyini azalttığı, ALT düzeylerinin düşük olduğu bildirilmiş; fakat bu iki parametrenin mutasyonla ilişkisinin zayıf olduğunu bildirilmiştir (14). Bizim çalışmamızda bu bulgulara benzer sonuçlar elde edildi. Mutasyonun karaciğer histopatolojik bulgularından inflamasyonu ve fibrozisi olumlu etkilediğini düşünülebilir. Bu sonuçların, CCR5 mutasyonu sonucu kemokinin reseptöre bağlanmadığını ve lenfosit göçünün azaldığı sonuçta karaciğerde inflamasyonun azaldığı yorumu yapılabilir.

Wald ve arkadaşları (12), CCR5 Delta 32 allel taşıyıcı HCV'li hastalarda karaciğer inflamasyonunun anlamlı derecede azaldığını bildirdiler. Bu sonucun KHC hastalarında klinik seyri ve son dönem sürece gidiş süresini yavaşlattığı bildirdiler.

Mascheretti ve arkadaşları (13), kemokin reseptörlerinden CCR2 mutasyonunun viral klerensi etkileyebileceği; diğer CCR gen mutasyonlarının KHC hastalarında klinik seyri, fibrozis derecesi ve tedaviye yanıt oranını etkilemediğini bildirdiler. Bizim bulgular bu çalışmanın sonuçları ile çelişmekteydi. Bu konuda yapılan başka çalışmalar bizim bulguları

desteklemektedir. Çünkü kemokinlerin inflamasyondaki rolleri kesindir. İnflamasyonun oluşabilmesi için inflamatuvar hücrelerin kemotaksisi gereklidir. Bu süreçte kemokin ve reseptörlerinin etkileşimi gereklidir. Mutasyonda bu ilişki sağlanamaz ve inflamasyon olayı daha yavaş seyreder. Woitas ve arkadaşları (11), CCR5 mutasyon taşıyan HCV hastalarında viral yükün yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da mutasyonlu hastalarda viral yükün yüksek olduğunu bulduk. Bu hasta grubunda mutasyon, inflamasyonu azaltmaktadır. Nitekim bizim bulgular HAI 'nin mutasyonlu grupta düşük olduğunu bulduk. Aynı grupta viral yük yüksek idi. HAI'nin düşük olması viral klirensi azaltmaktadır. Sonuçta viral yük fazla olmaktadır. Bu durum bir immün tolerans dönemini tartışmaya açabilir.

Bizim çalışmamızda, CCR5 mutasyonu ile karaciğer inflamasyon derecesi ve viral yük arasında anlamlı bir ilişki bulduk. Mutasyon, inflamasyonu azaltmakta ve bununla ilişkili olarak viral yük artmaktadır. Mutasyon saptanmayan hasta grubunda fibrozis ve serum ALT düzeyleri, mutasyonlu grupla karşılaştırıldığında yüksek değerler bulduk; fakat aradaki fark anlamlı değildi. İstatistiksel açıdan bu fark anlamlı olmazsa da mutasyonun fibrozis düzeyi ve ALT düzeylerini azalttığı görüldü. Mutasyonun inflamasyona etkisi sonucu, ALT düzeyi de düşük görülmektedir. Aynı ilişki viral yük için de düşünülebilir. Bu çalışmada mutasyonun viral yükü azalttığı ve bu sonucun inflamasyon derecesi ve serum ALT düzeyinin düşük olması sonucu artaya çıktığı düşünülebilir.

Kronik HCV hastalarında kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin doku ekspresyonun arttığı ve bu artışın doku inflamasyonu ve fibrozis düzeyi ile korele olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (69-75).

Zhdanov ve arkadaşları, kronik HCV enfeksiyonunda CC kemokinlerin ve ilişkili reseptörlerin karaciğer dokusundaki ekspresyonun periferik kanda değerlerinden daha yüksek olduğunu ve bu değerlerin karaciğer lezyonları ile daha sıkı ilişkisi olduğunu bildirmişlerdir (69). Kusano ve arkadaşları kronik HCV'de CC kemokinlerin portal ve periportal alanda ekspresyonlarının arttığı ve bu artışın inflamasyonla korele olduğunu bildirmişlerdir (70). Juan ve arkadaşları kronik HCV hastalarında kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin doku ekspresyonunun arttığı ve bu artışın doku inflamasyonu ve fibrozis düzeyi ile ilişkili olduğunu bildirdiler. Aynı çalışmada kemokin ve kemokin reseptör polimorfizminin doku ekspresyonunun azalttığı ve bu ilişkinin doku hasarını olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir (71). Larrubia ve arkadaşları kronik HCV hastalarda tedavi sonucunda kemokin ve kemokin reseptörlerinin azalmış düzeyde olduğunu bildirdiler (72). Marrija ve arkadaşları kronik HCV hastalarında intrahapatik kemokin ve kemokin reseptör düzeylerinin arttığı ve bu artışın karaciğer inflamasyonu fibrozis gelişiminde etkili ve korele olduğunu bulmuşlardır (74). Bu

çalışma sonuçlarına benzer bulgular Arantxa ve Charles' in çalışmalarında da bildirilmişti (74,75).

Bizim çalışmamızdaki sonuçlar bu konuda yapılan çalışmaları desteklemektedir. Nitekim biz kronik HCV hastalarında mutasyonu olan hasta grubunda reseptör ekspresyonu bulamadık. Aynı zamanda bu hastalarda HAI ve fibrozis düzeyleri mutasyonu olmayan gruba göre düşük idi. Buna karşılık, mutasyonu olmayan grupta ekspresyon düzeyi yüksekti ve buna paralel HAI ve fibrozis düzeyi de yüksekti. Sonuçta mutasyonun ekspresyonu azalttığı ve buna bağlı karaciğerdeki hasarın azaldığını düşünebiliriz.

Sonuç olarak; CCR5 polimorfizmi HCV'li hastalarda sağlıklı popülasyondan daha yüksektir. Bu mutasyon karaciğer inflamasyonu ve fibrozis düzeyini azaltmaktadır. Mutasyon doku ekspresyonunu azaltmakta ve bu etki karaciğerdeki inflamasyonu ve fibrozis düzeyini olumlu yönde etkilemektedir.

HCV enfeksiyonunda kemokinler karaciğer hasarını ilerletebilir. Gelecekte kemokin reseptör blokajı ve/veya modülasyonu inflamasyonu azaltmaları dolayısıyla başarılı tedavi markeri olarak değer kazanabilirler. Yeni çalışmalarla elde edilecek bilgiler, kemokinler ve reseptörlerinin HCV enfeksiyonunda potansiyel terapötik hedefler olabileceği düşünülebilir.

6. SONUÇLAR

1. Kronik HCV hastalarında gelişen karaciğer hasarında inflamasyon önemli bir süreçtir.
2. İnflamasyonda kemokin ve kemokin reseptörlerin önemli fonksyonları vardır.
3. CCR5 polimorfizmi kronik HCV hastalarında normal popülasyona göre yüksektir.
4. CCR5 doku ekspresyonu inflamasyon düzeyini arttırmaktadır
5. CCR5 polimorfizmi doku ekspresyonunu azaltmaktadır.
6. CCR5 polimorfizmi olan HCV'li hastalarda HAI ve fibrozis düzeyleri, mutasyonu olmayan grupla karşılaştırıldığında daha düşük tespit edildi.
7. Mutasyon tespit edilen hasta grubunda CCR5 ekspresyonu mutasyonu olmayan gruba göre daha düşük tespit edildi.
8. Mutasyon, doku ekspresyonunu azaltmakta ve bu etki karaciğerdeki inflamasyonu ve fibrozis düzeyini olumlu yönde etkilemektedir.
9. Gelecekte kemokin reseptör blokajı ve/veya modülasyonu inflamasyonu azaltmaları dolayısıyla başarılı tedavi markeri olarak değer kazanabilirler.
10. Yeni çalışmalarla elde edilecek bilgiler, kemokinler ve reseptörlerinin HCV enfeksiyonunda potansiyel terapötik hedefler olabileceği düşünülebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Funda Erkasar ÇITAK, Elvan Çağlar ÇITAK, Ceyda KARADENİZ. Kemokinler ve Hastalıklardaki Yeri. T Klin Tıp Bilimleri 2002; 22: 210-16.
2. Mine Çağlar, Emin Kansu. Kemokinler, Kemokin reseptörleri ve inflamasyon. ANKEM Derg 2004; 18:164-8.
3. M. Zeremski, L. M. Petrovic, A. H. Talal. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. Journal of Viral Hepatitis 2007;14:675-687.
4. Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. Immunol Today 2000;21:418-20.
5. Apolinario A, Majano P.L, Alvarez P.E, Saez A, Lozano C, Vargas J. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C:relationship with the histological activity of liver disease. American Journal of Gastroenterology 2002; 97:2861.
6. Shields P.L, Morland C.M, Salmon M, Qin S, Hubscher S.G, Adams S.H. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C infected liver. Journal of Immunology 1999; 163:6236.
7. Wenzel UO, Stahl RAK. Chemokines, Renal Disease, and HIV Infection. Nephron 1999; 81: 5-16.
8. Oberlin E, Amara A, Bacheleire F. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. Nature 1996;382:833-5.
9. Venkatesan S, Petrovic A, Van Ryk, Locati M, Weissman D, Murphy P.M. Reduced cell surface expression of CCR5 in CCR5Delta 32 heterozygotes is mediated by gene dosage, rather than by receptor sequestration. Journal of Biological Chemistry 2002; 277:2287.
10. Promrat K, McDermott D.H, Gonzales C.M, Kleiner D.E, Lessie M, Koziol D.E, et al. Associations of chemokine system polymorphisms with clinical outcomes and treatment responses of chronic hepatitis C. Gastroenterology 2003; 124:352.
11. Woitas R.P, Ahlenstiel G, Iwan A, Rockstroh J.K, Brackmann H.H, Kupfer B, et al. Frequency of the HIV protective CC chemokine receptor 5-Delta 32/Delta 32 genotype is increased in hepatitis C. Gastroenterology 2002; 122:1721-8.
12. Wald O, Pappo O, Ari Z.B, Azzaria E, Wiess I.D, Wald H, et al. CCR5 Delta 32 allele is associated with reduced liver inflammation in hepatitis C virus infection. European Journal of

Immunogenetics 2004;31:249-52.

13. Mascheretti S, Hinrichsen H, Ross S, Buggisch P, Hampe J, Foelsch U.R, et al. Genetic variants in the CCR gene cluster and spontaneous viral elimination in hepatitis C infected patients. *Clin Exp Immunol* 2004; 136:328-33.

14. Goulding C, Murphy A, MacDonald G, Barrett S, Crowe J, Hegarty J, et al. The CCR5Delta 32 mutation: impact on disease outcome individuals with hepatitis C infection from a single source. *Gut* 2005; 54: 1157-61.

15. Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and obular inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 360–69.

16. Kusano F, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Expression of C-C chemokines is associated with portal and periportal inflammation in the liver of patients with chronic hepatitis C. *Lab Invest* 2000; 80: 415–22.

17. Leifeld L, Dumoulin FL, Purr I et al. Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure. *J Pathol* 2003; 199: 335–44.

18. Apolinario A, Diago M, Lo Iacono O et al. Increased circulating and intrahepatic T-cell-specific chemokines in chronic hepatitis C: relationship with the type of virological response to peginterferon plus ribavirin combination therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 551–62.

19. Leroy V, Vigan I, Mosnier JF et al. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 829–41.

20. Nischalke HD, Nattermann J, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U, Dumoulin FL. Semiquantitative analysis of intrahepatic CC-chemokine mRNAs in chronic hepatitis C. *Mediators Inflamm* 2004; 13: 357–9.

21. Uluc SA. Viral Hepatitler. *Current Gastroenteroloji Tanı ve Tedavi*. Çev ed; Bülent Sivri, Ömür Gönen. 2. baskı 2007:546-62.

22. Dinçer D. Kronik Viral Hepatitler. *Mayo Klinik Gastroenteroloji ve Hepatoloji*. Çeviri ed; Ahmet Danalıoğlu, Fatih Beşışık. 1. baskı 2005:317-26.

23. Hepatit C enfeksiyonunda Tanı ve Tedavi. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği*. II. Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Rehberi. Kasım 2007 Antalya. 21-32.

24. Tözün N. HCV İnfeksiyonunun Türkiye Açısından Önemi” *Epidemiyoloji ve projeler*. Hepatit C Güncelleme Toplantısı. İstanbul; Ocak 2008: 1-4.

25. Massard J, Ratzu V, Thabut D, et al. Natural history and predictors of disease severity in

chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2006;44:19-24.

26. Yildirim B, Tahan V, Ozaras R, Aytekin H, Mert A, Tabak F, Senturk H. Hepatitis C virus risk factors in the Turkish community. *Dig Dis Sci* 2005 50;12:2352-5.

27. Tahan V, Karaca C, Yildirim B, Bozbas A, Ozaras R, Demir K, Avsar E, Mert A, Besisik F, Kaymakoglu S, Senturk H, Cakaloglu Y, Kalayci C, Okten A, Tozun N. Sexual transmission of HCV between spouses. *Am J Gastroenterol*. 2005 Apr;100(4):821-4.

28. Tahan V, Yildirim B, Ture F, Giral A, Ozdogan O, Imeryuz N, Avsar E, Mert A, Senturk H, Kalayci C, Tozun N. Anti-HCV seroprevalence in chronic HCV patients' children in Turkey. *J Clin Gastroenterol* 2004;38(1):90-1.

29. Ökten A :Türkiye'de Kronik Hepatit, Siroz ve Hepatosellüler Karsinoma Etiyolojisi. *Güncel Gastroenteroloji* 2003; 7 (3): 187-91.

30. Sümbül M. HCV enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve korunma. *Viral Hepatit* 2007. F.Tabak, İ Balık ve E Tekeli Ed.Oban matbaası 2007: 208-19

31. Karaca Ç. Epidemiyoloji; HCV Taraması için öneriler. *Hepatit C Güncelleme Toplantısı*. İstanbul; Ocak 2008: 23-8.

32. Akkız H, HCV enfeksiyonu.. *Epidemiyoloji ve korunma. Viral Hepatit* 2001, *Viral Hepatitle Savaşım Derneği*; K. Kılıçturgay (ed), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul :193-208.

33. Erek E, Ataman R, Dalmak S ve ark. Türkiye'de nefroloji-diyaliz ve transplantasyon 1991. *Türk Nefroloji Derneği Yayınları No:5*, İstanbul 1992.

34. Beşışık F, Ökten A, Sever M ve ark. Renal transplantasyon yapılmış hastalarda anti-HCV seropozitifliğinin klinik önemi. *Klinik* 1994;6:31-4.

35. Lio TC, Chan TT, Young TC, et al. Detection of HCV-RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* 1992;37:197-202.

36. Bresters D, Mauser-Bunschoten EP, Reesink HW, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1993;342:210-11.

37. Ogasawara S, Kage M, Kosai K, et al. Hepatitis C virus RNA in saliva and breastmilk of hepatitis C carrier mother's. *Lancet* 1993;341:561.

38. Gürakan B, Oran O, Yiğit Ş. Vertical transmission of hepatitis C virus. *N Engl Med* 1994;331:399.

39. Network EPHCV. Effects of mode of delivery and infants feeding on the risk of mother-to-child transmission of hepatitis C virus. *Br J Obstet Gynaecol* 2001;108:371-77.

40. Gibb DM, Moodal RL, Dunn DT, et al. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: Evidence for preventable peripartum transmission. *Lancet* 2000;356:904-7.

41. Menedez SR, Garcia MR, Sanchez san Roman S, et al. Intrafamilial spread of hepatitis C

virus. *Infection* 1991;19:431-3.

42. Mondello P, Hatti S, Vitale MG, et al. Anti-HCV antibodies in household contacts of patients with cirrhosis of liver-preliminary results. *Infection* 1991;20:51-2.

43. Hafta A, Çolakoğlu S, Akkız H, ve ark. Çukurova bölgesinde çeşitli risk gruplarında anti-HCV seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg.* 1996;1:46-9.

44. Bronowicki JP. Patient to transmission of hepatitis C during colonoscopy. *N Eng J Med* 1997;337:7.

45. Karaca C, Cakaloglu Y, Demir K, et al. Risk factors for the transmission of hepatitis C virus infection in the Turkish population. *Dig Dis Sci* 2006;51:365-9.

46. Bozdayı M. HCV Genotipleri : İsimlendirme, epidemiyoloji ve saptama yöntemleri. *Hepatit C Güncelleme Toplantısı.* İstanbul; Ocak 2008: 47-8.

47. Yılmaz F. Kronik C hepatiti histolojisi; En iyi skorlama sistemi hangisi?. *Hepatit C Güncelleme Toplantısı.* İstanbul; İstanbul; Ocak 2008: 61-4.

48. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-5.

49. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histologic grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-9.

50. Bedossa P, Poynard T and The French Metavir. Cooperative study group. An algorithm for grading activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 24: 289-93.

51. Demirtürk L. Kronik C hepatiti tedavisi, standartlar nelerdir? *Hepatit C Güncelleme Toplantısı.* İstanbul; Ocak 2008: 101-4.

52. Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, Moser M. İnterleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:569-77.

53. Sica A, Sacconi A, Borsatti A, Power CA, Wells TN, Luini W, et al. Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J Exp Med* 1997;185:969-74.

54. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997;277:2005-7.

55. Lodi PJ, Garrett DS, Kuszewski J, Tsang ML, Weatherbee JA, Leonard WJ, et al. High-resolution solution structure of the beta chemokine MIP by multidimensional NMR. *Science* 1994;263:1762-7.

56. Humbert M, Ying S, Corrigan C, Menz G, Barkans J, Pfister R et al. Bronchial mucosal expression of the genes encoding chemokines RANTES and MCP-3 in symptomatic atopic and nonatopic asthmatics: relationship to the eosinophil-active cytokines interleukin (IL)-5, granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, and IL-3. *Am J Respir Celi Mol Biol* 1997;16:1-8.
57. Arimilli S, Ferlin W, Solvason N, Deshpande S, Howard M, Mocci S. Chemokines in autoimmune diseases. *Immunol Rev* 2000;177:43-51.
58. Grady T, LiangP, Ernst SA, Logsdon CD. Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;113:1966-75.
59. Lanford RE, Guerra B, Chavez D et al. Cross-genotype immunity to hepatitis C virus. *J Virol* 2004; 78: 1575–81.
60. Major ME, Dahari H, Mihalik K, et al. Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. *Hepatology* 2004; 39: 1709–20.
61. Glass WG, Chen BP, Liu MT, Lane TE. Mouse hepatitis virus infection of the central nervous system: chemokinemediated regulation of host defense and disease. *Viral Immunol* 2002; 15: 261–72.
62. Friedman SL. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38:38–53.
63. Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; 124: 97–104.
64. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 34: 730–39.
65. Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* 2003; 37: 577–89.
66. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard D, et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003; 302: 659–62.
67. Nattermann J, Nischalke HD, Feldmann GAhlenstiel G, Sauerbruch T, Spengler U. Binding of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor 5. *J Viral Hepat* 2004; 11: 519–26.
68. Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ et al. Association of genetic variants of the

- chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 2003; 38: 1468–76.
69. Zhdanov KV, Gusev DA, Chirski VS, Sysoev KA, Iakubovskaia LA, et al. Chronic HCV infection and expression of mRNA of CC chemokines and their receptor. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2008 ;(4):73-8.
70. Kusano E, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Expression of C-C chemokines is associated with portal and periportal inflammation in the liver of patient with chronic hepatitis C. *Lab Invest* 2008;80:415 – 22.
71. Juan RL, Selma BM, Miryam C, Eduardo S, Trinidad PC. The role of chemokines and their receptor in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2008; 14(47):7149-59.
72. Larrubia JR, Calvino M, Benitto S, Sanz VE, Perna C, Perez HJ, et al. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8 cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2007; 47(5):632-41.
73. Marijia Z, Lydia MP, Luis C, Queenie BB, Herman TY, Milan K, et al. Intrahepatik levels of CXCR3 associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008; 48(5):1440-50.
74. Arantxa A, Pedro LM, Eduardo AP, Alicia S, Carlos L, Javier V, et al. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *The American Journal of Gastroenterology* 2002;97:2861-70.
75. Charles EH, Jeffrey JP, Patricia P, Anthony JF, Rosemary AF, Rakesh KM, et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 74:360-9.