

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HEPATİT C VİRÜS (HCV) ENFEKSİYONLARINDA
KEMOKİNLERİN ROLÜ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ORÇUN ZORBOZAN**

**DANIŞMAN
PROF.DR. İLKNUR KALELİ**

DENİZLİ - 2013

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HEPATİT C VİRÜS (HCV) ENFEKSİYONLARINDA
KEMOKİNLERİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ORÇUN ZORBOZAN

DANIŞMAN

PROF.DR. İLKNUR KALELİ

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 05.10.2011 tarih ve 2011TPF033 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2013

Prof. Dr. İlknur KALELİ danışmanlığında Dr. Orçun ZORBOZAN tarafından yapılan “Hepatit C Virüs (HCV) Enfeksiyonlarında Kemokinlerin Rolü” başlıklı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Prof. Dr. İlknur KALELİ

ÜYE

Prof. Dr. Çağrı ERGİN

ÜYE

Yard. Doç. Dr. Ergun METE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

10.../10/2013

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANI

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma boyunca bana yol gösteren ve her zaman güven ve desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. İlknur KALELİ'ye sonsuz minnet ve teŐekkürlerimi sunarım.

Tıp eğitimimin ilk gününden itibaren bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım Prof. Dr. ağrı ERGİN, Doç. Dr. Melek DEMİR, Doç. Dr. Nural CEVAHİR, Yard. Doç. Dr. Mustafa ŐENGÜL ve Yard. Doç. Dr. Ergun METE'ye , rneklelerin toplanması için kliniğini bize açan Prof. Dr. Hüseyin TURGUT'a, tezimin istatistik çalışmaları konusunda bana destek olan sevgili hocam Prof. Dr. Mehmet ZENCİR'e, çalıŐmanın çeşitli aŐamalarında bana destek olan Nilgün ARIKAN ve Kemal ERTOSUN'a, asistanlık eğitimim süresince bildiklerini benden esirgemeyen kıdemlim Uzm. Dr. zgn KİRİŐ SATILMIŐ'a ve beraber bol bol vakit geçirdiğimiz mesai arkadaŐlarıma teşekkür ederim.

En değerli varlığım eŐime ve doğmasını dört gözle beklediğimiz oğlumuzu teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
ÖZET	XII
SUMMARY.....	XIV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
HCV EPİDEMİYOLOJİSİ.....	3
HCV BULAŞ YOLLARI	3
Kan Transfüzyonu Yolu ile Bulaş	4
İntravenöz İlaç Bağımlılığı ile Bulaş.....	4
Cinsel Yol ile Bulaş.....	4
Nozokomiyal Bulaş	5
Mesleki Bulaş	5
Perinatal Bulaş.....	5
Aile İçi Bulaş.....	5
HCV YAPISI VE SINIFLANDIRILMASI.....	6
Virion Yapısı ve Fiziksel Özellikleri.....	6
Hücreye Tutunma ve Giriş.....	6
Genom Yapısı	7
Translasyon ve Proteolitik İşlemler	8
Yapısal Proteinlerin Özellikleri	8
Yapısal Olmayan Proteinlerin Özellikleri	9
RNA Replikasyonu ve Virüsün Oluşumu	10
HCV PATOFİZYOLOJİSİ.....	11
Karaciğerin Kronik İnflamatuvar Lezyonlarının Patofizyolojisi.....	11
Fibrozis Gelişim Mekanizması.....	11
Hepatoselüler Karsinom Gelişimi.....	12

HCV KLİNİĞİ.....	12
Akut Hepatit C Enfeksiyonu.....	12
Kronik Hepatit C Enfeksiyonu	13
HCV Enfeksiyonunda Doğal Seyir.....	14
HCV Enfeksiyonunda Karaciğer Dışı Tutulumlar	14
HCV LABORATUVAR TANISI	15
Serolojik Yöntemler.....	15
Moleküler Yöntemler.....	16
HCV Enfeksiyonunda Tanısal Yaklaşım.....	17
HCV TEDAVİSİ VE TEDAVİYE DİRENÇ	17
HCV Tedavisi	17
HCV Enfeksiyonunda Tedaviye Direnç	18
KEMOKİNLER VE KEMOKİN RESEPTÖRLERİ.....	20
Kemokinlerin Moleküler Yapısı	20
Kemokin Reseptörleri.....	21
Kemokinlerin İşlevleri	22
KEMOKİNLER İLE HEPATİT İLİŞKİSİ.....	28
ELR “-” Kemokinler ve Hepatit C.....	29
CC Kemokinler ve Hepatit C.....	30
CCR5 DELTA 32 DELESYONU	31
GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	32
Hasta Grubu	32
Kontrol Grubu.....	32
Etik Kurul Onayı.....	32
ÖRNEKLERİN TOPLANMASI.....	32
KULLANILAN CİHAZLAR	33
KULLANILAN SARF MALZEMELERİ.....	33
KULLANILAN KİTLER	33
KULLANILAN ANTİKORLAR	33
KEMOKİN RESEPTÖR DÜZEYLERİNİN TESPİT EDİLMESİ	34
Akım Sitometri Prensipleri	34
Akım Sitometri İşlem Basamakları	35

KEMOKİN LİGAND DÜZEYLERİNİN TESPİT EDİLMESİ.....	36
CC Kemokin Ligand 3 (CCL3, MIP-1 α).....	37
CC Kemokin Ligand 4 (CCL4, MIP-1 β).....	39
CC Kemokin Ligand 5 (CCL5, RANTES).....	41
CXC Kemokin Ligand 9 (CXCL9, MIG).....	43
CXC Kemokin Ligand 10 (CXCL10, IP-10).....	46
CCR5 DELTA 32 DELESYONUNUN SAPTANMASI.....	47
Genomik DNA'nın Elde Edilmesi.....	47
Real Time PCR.....	49
VERİLERİN ANALİZİ.....	51
BULGULAR.....	53
TARTIŞMA.....	60
SONUÇLAR.....	73
KAYNAKLAR.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ALT:** Alanin Amino Transferaz
C: Lenfotaktin
CC: Beta Kemokin
CLDN-1: Claudin-1
CX₃C: Fraktalkin
CXC: Alfa Kemokin
CXCL: CXC Kemokin Ligandı
CXCR: CXC Kemokin Reseptörü
DARC: Kemokin İçin Duffy Antijen Reseptörü
EIA: Enzim İmmün Assay
ELR: Glutamat- Lösün- Arjinin
ETR: Tedavi Sonu Yanıtı
EVR: Erken Virolojik Yanıt
FSC: Forward Scatter
HBV: Hepatit B Virüs
HCC: Hepatosellüler Karsinom
HCV: Hepatit C Virüs
HIV: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HOMA: Homeostaz Model Değerlendirmesi
IRES: İç Ribozom Giriş Bölgesi
LDL: Düşük Dansiteli Lipoprotein
MAPKs: Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinazlar
NANBH: Non-A Non-B Hepatit
OCLN: Occludin
ORF: Açık Okuma Penceresi
PAMP: Patojen İlişkili Moleküler Patern
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKB: Protein Kinaz B
PLC: Fosfolipaz C
PRR: Patern Tanıyan Reseptör
RVR: Hızlı Virolojik Yanıt
SR-BI: Çöpçü Reseptör Tip BI

SSC: Side Scatter

SVR: Kalıcı Virolojik Yanıt

Tc1: Sitotoksik T Hücresi Tip 1

Th1: Yardımcı T Hücresi Tip 1

TLR: Toll Benzeri Reseptör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. HCV'nin dünyadaki yaygınlığı	3
Şekil 2. HCV'nin hücreye tutunması ve girişi	7
Şekil 3. HCV genomu ve gen ekspresyonları	8
Şekil 4. Kronik HCV enfeksiyonunda tedavi algoritması	19
Şekil 5. Kemokinlerin moleküler yapısı	21
Şekil 6. Kemokin reseptör sinyalleri	22
Şekil 7. Lökosit göçünde kemokinlerin rolü.....	23
Şekil 8. HCV enfeksiyonunda inflamatuvar döngü	29
Şekil 9. FACSCalibur optik sistemi	34
Şekil 10. Akım sitometri analiz grafikleri	36
Şekil 11. CCL3 standart dilüsyonu	38
Şekil 12. CCL3 kalibrasyon eğrisi.....	39
Şekil 13. CCL4 standart dilüsyonu	39
Şekil 14. CCL4 kalibrasyon eğrisi.....	41
Şekil 15. CCL5 standart dilüsyonu	41
Şekil 16. CCL5 kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil 17. CXCL9 standart dilüsyonu	44
Şekil 18. CXCL9 kalibrasyon eğrisi	45
Şekil 19. CXCL10 standart dilüsyonu	46
Şekil 20. CXCL10 kalibrasyon eğrisi.....	47
Şekil 21. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımları	53
Şekil 22. Hasta grubunun virolojik yanıt dağılım grafiği	54

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Virolojik yanıtla ilgili tanımlamalar	17
Tablo 2. Kemokin reseptörleri ve ligandları	24
Tablo 3. Delta 32 delesyon primerleri	49
Tablo 4. LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	50
Tablo 5. Viremik ve viremik olmayan hasta gruplarının özellikleri	54
Tablo 6. Hasta ve kontrol gruplarının özelliklerinin karşılaştırılması	55
Tablo 7. Hasta ve kontrol gruplarının kemokin reseptör düzeyleri	55
Tablo 8. Hasta ve kontrol gruplarının kemokin ligand düzeyleri	56
Tablo 9. Viremi durumuna göre kemokin reseptör düzeyleri	57
Tablo 10. Viremi durumuna göre kemokin ligand düzeyleri	58
Tablo 11. HCV-RNA düzeyine göre kemokin reseptör düzeyleri	59
Tablo 12. HCV-RNA düzeyine göre kemokin ligand düzeyleri	59

ÖZET

Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonlarında kemokinlerin rolü

Dr. Orçun ZORBOZAN

HCV yoğun inflamatuvar cevap sonucunda karaciğerde fibrozis ile siroza ve hepatoselüler karsinoma kadar ilerleyebilen ve yüksek mortalite ile giden bir tablo oluşturmaktadır. İnflame karaciğere lökosit göçünde kemokinler ve reseptörleri kilit role sahiptir. İnflamasyonun devamlılığı ile sağlanan karaciğer rejenerasyonu, karaciğer fibrozisi ve malign transformasyonla da kemokinlerin ilişkili olabilecekları bildirilmektedir. Virüsün hastaya verdiği zararın dışında antiviral tedavide kullanılan ajanların da ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Tedavi süresinin ve dozunun belirlenmesinde HCV'nin genotipi karar verdiricidir ancak tedavi yanıtına ilişkin kesinleşmiş bir belirteç henüz mevcut değildir. Bu çalışma HCV ile enfekte hastalarda kemokin reseptörlerinin ve bu reseptörlerle ilişkili kemokin düzeylerinin ve CCR5 delta-32 delesyonunun HCV enfeksiyonunun patogenez ve özellikle tedavi yanıtındaki rolünü incelemek amacıyla planlanmıştır.

Çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran 50 kronik HCV enfeksiyonlu hasta ve 28 sağlıklı kontrol dahil edildi. Hasta ve kontrol gruplarında serum CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri, periferik kan CD8⁺ hücrelerin CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonları ve CCR5 delta 32 delesyonunun varlığı incelendi. Tedavi yanıtına göre gruplandırılan hastalar (33 yanıtlı, 17 yanıtız) incelenen parametreler için kontrol grubu ile ve birbirleri ile kıyaslandı. Hasta gruplarında hem CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin hem de CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzdesi kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.021$) ancak hasta grupları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.872$). Hasta gruplarında serum CCL3, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunur iken, serum CCL4 ve CCL5 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Serum CCL3, CCL4, CCL5 ve CXCL9 düzeyleri açısından yanıtlı ve yanıtız hasta grupları arasında anlamlı fark bulunmaz iken, CXCL10 düzeyleri yanıtız hasta grubunda yanıtlı hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.001$). Viremi varlığına göre hastalar gruplandırıldığında CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzdesi açısından ve CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzdesi açısından

anlamli fark bulunmadı. Serum CCL3, CCL4 ve CCL5 düzeyleri açısından viremik hastalarla viremik olmayan hastalar arasında anlamli fark bulunmaz iken CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri viremik hastalarda viremik olmayan hastalara göre anlamli olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.008$ ve $p<0.001$). Çalışmadaki katılımcıların tamamı CCR5 geni için homozigot doğal tip olarak bulundu.

Bu araştırmadan elde edilen bulgulara göre kronik HCV enfeksiyonu bulunanlarda CD8⁺ hücrelerin yüzeyinde CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptörlerinin ekspresyonu yüksektir ancak tedavi grupları arasında fark bulunmamıştır. Bu araştırma CCR5 ile ilişkili ligand CCL3 ve CXCR3 ile ilişkili ligandlar olan CXCL9 ve CXCL10 kemokinlerinin HCV enfeksiyonunda rolü olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte bu ligandlardan sadece CXCL10 tedavi yanıtı ile ilişkili bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: HCV, kemokin, tedavi yanıtı, delta 32

SUMMARY

The role of chemokines in hepatitis C virus (HCV) infection

Dr. Orçun ZORBOZAN

HCV causes a clinical course with liver fibrosis which progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma, as a result of an intense inflammatory response, that causes high mortality. Chemokines and their receptors are shown as the key players for leukocytes circulation into inflamed liver in several studies. Chemokines have been reported to be related with liver regeneration provided by continuous inflammation, fibrosis and malignant transformation. Except for the harm caused by the virus itself, there are also serious side effects of antiviral agents used in the treatment. HCV genotype is used for determining the duration and the dose of treatment but there is not yet a definitive marker of treatment response. This study is designed to investigate the relationship between chemokine receptors, their related chemokines, CCR5 delta-32 deletion and HCV infection pathogenesis and especially treatment response.

Fifty chronic HCV-infected patients and 28 healthy controls who referred to Pamukkale University Hospital Infectious Diseases Outpatient Clinic were included in this study. For patient and control groups, serum CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 and CXCL10 levels, CCR5 and CXCR3 surface expression of peripheral blood CD8⁺ cells, and CCR5 delta 32 deletion were evaluated. The patients divided into groups according to treatment responses (33 responders and 17 nonresponders) and were compared with the control group and with each other for these parameters evaluated. In both groups of patients the percentage of CCR5⁺-CD8⁺ lymphocytes as well as the percentage of CXCR3⁺-CD8⁺ lymphocytes were significantly higher than the control group ($p=0.001$ and $p=0.021$, respectively), but there was no significant difference between the patient groups ($p=0.872$). Serum levels of CCL3, CXCL9 and CXCL10 were significantly higher in patient groups than the control group, while the serum levels of CCL4 and CCL5 were not significantly different between the groups. Serum CCL3, CCL4, CCL5, and CXCL9 levels were not significantly different between responders and nonresponders patient groups, while CXCL10 levels in nonresponders patient group were significantly higher than those of responders patient group ($p=0.001$). While patients were grouped according to the presence of

viremia, the percentage of CCR5⁺-CD8⁺ lymphocytes or CXCR3⁺-CD8⁺ lymphocytes were not significantly different between the patient groups. For serum CCL3, CCL4, and CCL5 levels, no significant difference was found between non-viremic patients and viremic patients, while CXCL9 and CXCL10 levels were significantly higher in viremic patients than non-viremic patients ($p=0.008$ and $p<0.001$, respectively). All participants in the study were wild-type homozygous for the CCR5 gene.

According to findings of this study, CCR5 and CXCR3 surface expression of the CD8⁺ cells were increased in chronic hepatitis C infection but there were no difference between the patient groups. The present study showed that CCR5 associated ligand CCL3 and CXCR3 associated ligands CXCL9 and CXCL10 were involved in HCV infection. However, only CXCL10 was associated with response to treatment.

Keywords: HCV, chemokine, treatment response, delta 32

GİRİŞ

Hepatit C virüs (HCV), 1989 yılında non-A non-B hepatitli (NANBH) bir hastanın kanı ile enfekte bir şempanzeden viral RNA'nın izolasyonu ile tanımlanmıştır (1). İkinci Dünya Savaşı'ndan 1980'lere kadar gelişmiş ülkelerde HCV bulaşının en sık nedenleri parenteral olarak kontamine kan ve kan ürünlerine maruziyet ya da yasa dışı enjektabl ilaç kullanımı iken, transfüzyon öncesinde kanların HCV açısından rutin taranmasıyla birlikte kan transfüzyonuna bağlı bulaş azalmıştır. Dünyada en çok Afrika ve Doğu Akdeniz'de olmak üzere 130-170 milyon HCV taşıyıcısı vardır. Enfekte bireylerin %50-85'inde HCV RNA pozitifliği ile belirlenen kronik enfeksiyon gelişir. Kronik enfeksiyonu olan hastaların %25'inde siroz gelişirken bunların çoğu da hepatosellüler karsinoma (HCC) ileler (2).

Viral enfeksiyonu takiben birçok pro-inflamatuar mediatör, immün hücrelerin karaciğere giderek antiviral immün yanıt oluşturmaya katkıda bulunur. Bununla birlikte bu güçlü immün yanıt virüsü ortadan kaldırmayı başaramazsa kronik enfeksiyon oluşur. Bu durumda çoğu vakada siroz ve HCC gelişimi ile sonuçlanan inflamasyon, rejenerasyon ve fibrozis birbirini takip eder. Mevcut birçok yayın, inflame karaciğere lökosit dolaşımında kemokinleri ve kemokin reseptörlerini kilit rol alan oyuncular olarak göstermektedir. Ayrıca kemokinler inflamasyonun devamlılığı ile sağlanan karaciğer rejenerasyonu, fibrozis ve malign transformasyonla da ilişkili olabilirler (3).

HCV'ye özgü T hücrelerin enfeksiyonu kontrol altına alması için kemokinler ve kemokin reseptörleri arasındaki ilişki esansiyeldir. Kazanılmış immün cevap bu görevi yerine getiremezse, enfeksiyonu kontrol etme kapasitesine sahip olmayan non-spesifik T hücreler de karaciğere göç ederek kalıcı karaciğer hasarına yol açarlar. Kemokin reseptör ekspresyonunun ve kemokin salgılanmasının düzenlenmesi, enfeksiyonun erken fazında özgün T hücre göçünü engelleyerek ve kronik fazında non-spesifik T hücre göçünü bozarak karaciğer canlılığını sağlamak suretiyle viral kaçış mekanizması olabilir. Bazı kemokinler ve reseptörleri karaciğer hasarı ile korelasyon göstermektedir, CXCL10 ve CXCR3 düzeyleri tedaviye yanıt tahmin etmede fayda sağlamışlardır. Karaciğer inflamasyonunu azaltmak ve

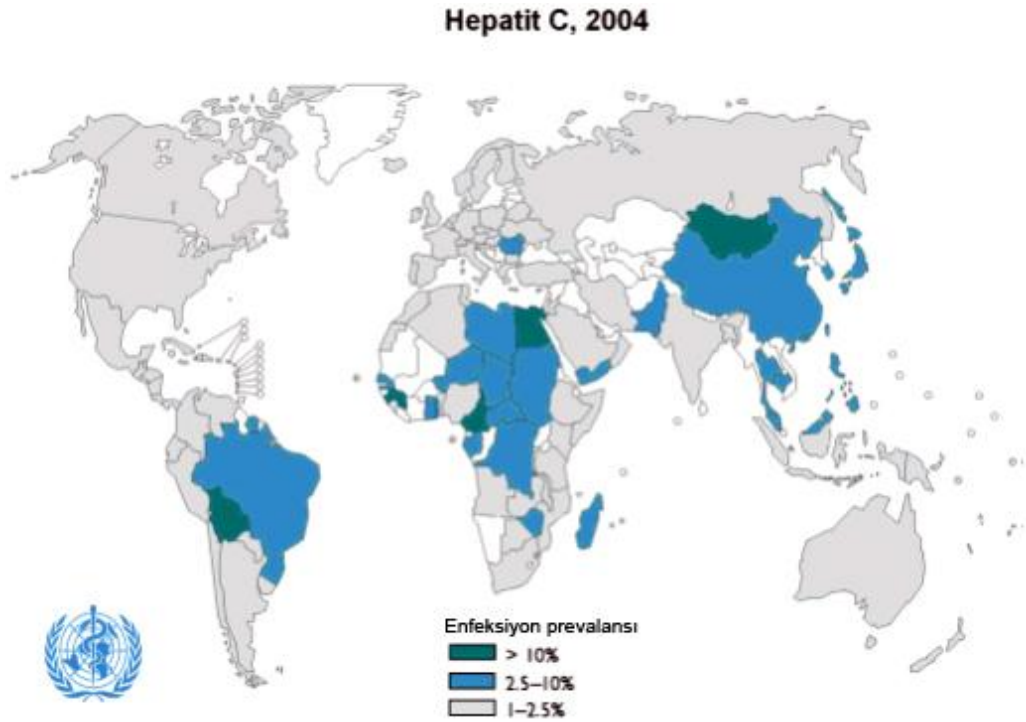
karaciğere özgün T hücrelerinin göçünü sağlamak için gelecekte kemokinler ve reseptörlerinin düzenlenmesi potansiyel terapötik hedef olabilir (4).

Bu çalışmada HCV ile enfekte hastalarda kemokin düzeylerinin, kemokin reseptör düzeylerinin ve CCR5 delta-32 mutasyon varlığının araştırılması ve tedaviye yanıtı ve yanıtı olmayan hasta grupları arasında fark olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

HCV EPİDEMİYOLOJİSİ

HCV kronik karaciğer hastalığının önde gelen sebeplerinden biri olup önemli bir halk sağlığı sorunudur. 1989 yılında Choo ve ark. tarafından tanımlanmış ve NANBH olgularının etkeni olduğu kanısına varılmıştır (1). Tüm dünyada HCV enfeksiyonunun prevalansı yaklaşık %2,2-3'tür ve bu oran 130-170 milyon insana karşılık gelmektedir (2). Prevalansın en düşük olduğu bölgeler İngiltere ve İskandinav ülkeleri olup %1'in altında iken, en yüksek prevalansa sahip bölge olan Mısır'da bu değer %15-20'dir. Ülkemizde ise HCV prevalansı %1-1,9'dur (5). Dünyada HCV'nin yaygınlığı harita üzerinde gösterilmiştir (Şekil 1) (2).



Şekil 1. HCV'nin dünyadaki yaygınlığı (2)

HCV BULAŞ YOLLARI

HCV için en etkili ve en yaygın bulaş yolu parenteral bulaştır. Kan transfüzyonu ve ortak enjektör kullanımı parenteral bulaşın ana bileşenleri iken kanların rutin taramalarının yapılması ile birlikte transfüzyon ilişkili HCV enfeksiyonu çok nadir görülmeye başlanmıştır. Bugün için en önemli risk faktörü

damar içi ilaç kullanımınıdır. Bununla birlikte birçok hastada bilinen kan veya damar içi ilaç maruziyeti öyküsü bulunmamaktadır (6).

Kan Transfüzyonu Yolu ile Bulaş

Gelişmiş ülkelerde kan ürünlerinin güvenliğinin artması ile birlikte transfüzyon yolu ile HCV bulaşı çok nadir görülmeye başlanmıştır; 1994'ten bu yana rapor edilen olgu bulunmamaktadır. Gelişmiş ülkelerde klinisyenler eski transfüzyon ilişkili HCV enfeksiyonlarına bağlı siroz gibi uzun dönem komplikasyonlar ile karşı karşıyadırlar (7).

Gelişmekte olan ülkelerde ise modern kan bankacılığı sistemlerinin kurulamamış olmasına bağlı olarak kan ve kan ürünleri yoluyla bulaş HCV enfeksiyonunun yayılmasındaki önemini korumaktadır. Dünya Sağlık Örgütü küresel kan güvenliği veritabanının verilerine göre gelişmekte olan ülkelerde kan bankalarındaki kanların %43'ü transfüzyon ile bulaşan etkenler açısından taranmamaktadır (8).

İntravenöz İlaç Bağımlılığı ile Bulaş

İntravenöz ilaç kullanımı gelişmiş ülkelerde HCV bulaşının en sık karşılaşılan yoludur (8). Ortak enjektör kullanımı esas bulaş yolu olmakla birlikte uyuşturucu maddenin hazırlanması esnasında kullanılan diğer araçlar da HCV bulaşına yol açabilmektedir (9).

Cinsel Yol ile Bulaş

HCV'nin cinsel yolla bulaşı mümkündür ancak ne ölçüde bulaştığı net değildir. Cinsel yolla HCV bulaşı ile ilgili çalışmalarda bulaşa sebep olabilecek diğer etkenlerin dışlanamamasına bağlı olarak çelişkili bulgular elde edilmektedir (10). Hem seminal sıvı hem de vajinal salgılarda HCV izole edilebilmesine karşın erkekten kadına bulaş ihtimali daha fazladır. Seminal sıvıda HCV-RNA pozitifliği ve yüksek viremi düzeyine ek olarak genital mukoza bütünlüğünün bozulmuş olması da bulaş riskini artırmaktadır (11).

Nozokomiyal Bulaş

Hastane ortamında gerçekleşen HCV bulaşı nozokomiyal HCV bulaşı olarak tanımlanmaktadır. Kontamine kan transfüzyonu veya enfekte organ transplantasyonu sonucu bulaş olabilmekle birlikte en iyi bilinen örneği hemodiyaliz yoluyla bulaştır (12). Hemodiyaliz tedavisi uygulanan hastalarda HCV prevalansı toplumun geneline göre yüksektir (13). Coğrafi bölgelere göre prevalans %10 ile %65 arasında değişmektedir. Prevalans hemodiyaliz yapılan sürecin uzunluğu ve bu süreçte transfüzyonu yapılan kan ürünlerinin sayısı ile ilişkilidir (14).

Güvenli olmayan terapötik enjeksiyonlar da önemli bir nozokomiyal bulaş nedenidir. Dünyada her yıl 2 milyon kişinin kontamine enjektörlerle yapılan terapötik enjeksiyonlar sonucu HCV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir (8).

Mesleki Bulaş

Mesleki bulaş büyük ölçüde damar içi girişimler esnasında kontamine olan iğne ile meydana gelen perkütan yaralanmalara bağlıdır. Mesleki bulaş riskinin en yüksek olduğu sağlık çalışan grupları cerrahlar ve laboratuvar teknisyenleridir. Perkütan yaralanma sonrasında HCV bulaş riski %0.5 olarak bildirilmiştir ancak viremik olmayan hastalara yapılan işlemler sırasında oluşan yaralanmalarda risk sıfırdır (15).

Perinatal Bulaş

Anneden bebeğe HCV bulaş oranı %5'tir. Bulaş riski insan immün yetmezlik virüsü (HIV) koenfeksiyonu bulunan HCV enfeksiyonlu annelerde en fazladır. Bulaşla ilişkili olduğu bilinen bir diğer risk faktörü ise annenin viral yükünün fazla olmasıdır. Doğum şekli (vajinal doğum veya sezaryen) ve emzirme de araştırılan diğer risk faktörleridir ancak anlamlı ilişki gösterilememiştir (16).

Aile İçi Bulaş

Hepatit B virüsü (HBV) için olduğu gibi HCV için de aile içi bulaş söz konusudur ancak bulaşın olması için, HCV serum viral yükünün dolayısıyla sekresyonlardaki HCV viral yükünün HBV'ye kıyasla daha düşük olması nedeniyle, enfeksiyon kaynağına tekrarlayan ve uzun yıllara yayılan maruziyet gerekmektedir.

Bulaşma riski kaynak kişinin karaciğer hastalığının ciddiyeti, kaynak kişi ile maruziyet süresinin uzunluğu, aile içindeki HCV pozitif birey sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Makalelerin sistematik derleme çalışmasında kronik karaciğer hastalıklı kişi ile ev içi teması olan 1332 erişkinden 51'inin (%3.83) HCV pozitif olduğu gösterilmiştir (17).

HCV YAPISI VE SINIFLANDIRILMASI

HCV *Flaviviridae* familyasının *Hepacivirus* genusunun üyesidir. Tanımlanan ilk üyesi olan *Flavivirus*'un oluşturduğu sarı humma hastalığı nedeniyle familyaya Latince sarı anlamına gelen flavus kelimesinden köken alan bu isim verilmiştir. *Flaviviridae* familyası *Flavivirus*, *Pestivirus* ve *Hepacivirus* genuslarından oluşmaktadır (18).

HCV'nin 7 genotipi, bu genotipler içerisinde de çok sayıda subtipi bulunmaktadır (19). Bu çeşitliliğin kaynağı hata yapmaya eğilimli RNA polimerazın yüksek mutasyon oranıdır (20).

Virion Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

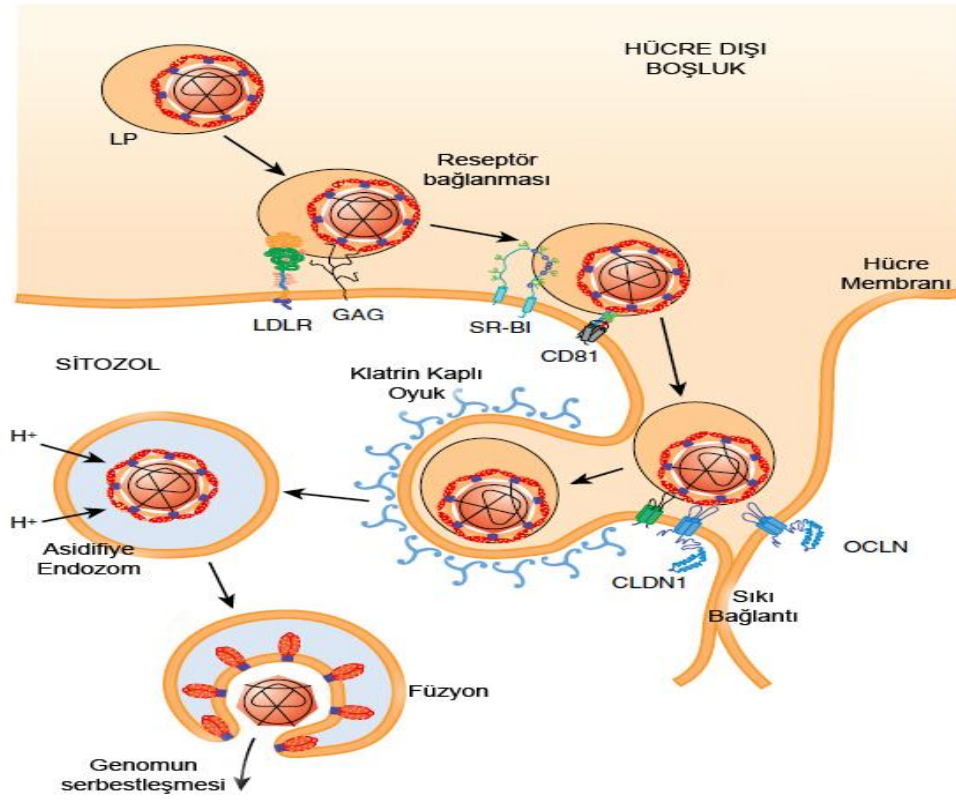
Küresel şekle sahip olan virion 50 nm çapındadır. Lipid yapısında bir zarfa sahiptir. Viral nüve de küreseldir ve 30 nm çapındadır. Virion ısıya, organik çözücülere ve deterjanlara duyarlıdır (19). Protein bileşimi halen tanımlanmamış olmasına karşın virionun bir temel C proteini ve iki zarf glikoproteini kodladığı bilinmektedir (18).

Hücreye Tutunma ve Giriş

HCV'nin konak hücreye tutunması ve girişi karmaşık ve basamaklı bir süreçtir. Tutunma için HCV E1 ve E2 glikoproteinleri esansiyeldir. Çeşitli model sistemleri ile HCV ile ilişkili çok sayıda hücre yüzey molekülü tanımlanmıştır. Bu moleküller arasında aşırı sülfatlanmış heparan sülfat ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptörü viral tutunma ve bağlanmaya aracılık ederken CD81, çöpçü reseptör tip BI (SR-BI) ile sıkı bağlantı proteinleri olan claudin-1 (CLDN-1) ve occludin (OCLN) bağlanma sonrasında görev almaktadır (21). Hepatositlerde yoğun bir şekilde eksprese edilen ve lipoproteinlerden kolesterol ve kolesterol esterlerinin seçilmesini

sağlayan SR-BI molekülünün, kültüre edilmiş hepatoma hücrelerine HCV E2 glikoproteinini bağlanmasını sağladığı ve tutunmada rol alabileceği gösterilmiştir. Özellikle HCV'nin E2 glikoproteinini ile sıkı bir şekilde bağlanmakta olan CD81 molekülünün tutunma sonrasındaki aşamada görevli olduğu düşünülmektedir. HCV E2 glikoproteinine bağlanabilen diğer moleküller olan C tipi lektinlerin ise tutunmadan çok yeni konak hücrelerine yayılımında rolü olduğu sanılmaktadır (18).

Tutunmayı takiben HCV muhtemelen clathrin aracılı endositoz ile hücre içine alınmaktadır. Prodüktif bir girişin olması viral glikoproteinlerin füzojenik forma geçmesini tetikleyen endosomal bölgenin asidifikasyonuna bağlıdır (18). HCV'nin hücreye tutunması ve girişinin aşamaları şekilde gösterilmiştir (Şekil 2) (22).

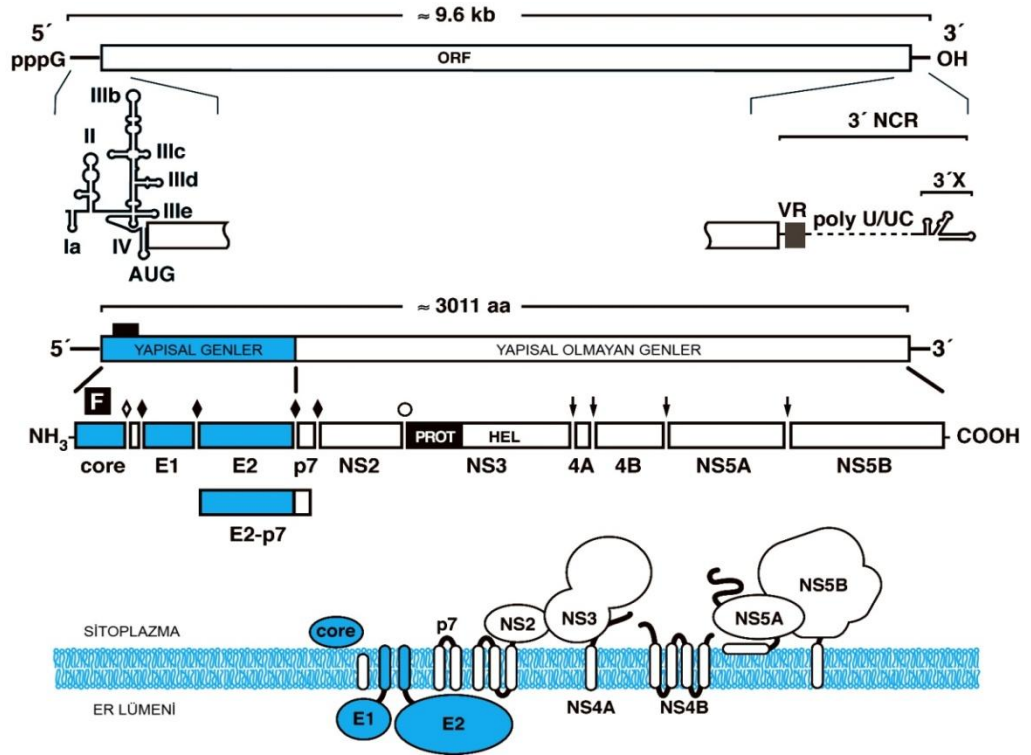


Şekil 2. HCV'nin hücreye tutunması ve girişi (22).

Genom Yapısı

HCV virionu tek iplikli pozitif polariteli RNA içermektedir. Genom yaklaşık 9.6 kb uzunluğundadır. 5' kodlanmayan bölge 340 nükleotid uzunluğundadır ve bir iç ribozom giriş bölgesi (IRES) içermektedir. 3' kodlanmayan bölge ise 50 nükleotid

uzunluğunda sekans değişken bölge, yaklaşık 100 nükleotid uzunluğunda polipirimidinden zengin bölge ve iyi korunmuş 98 nükleotid uzunluğunda 3' terminal bölgeyi içermektedir (19). Ek olarak 5' kodlanmayan bölgede karaciğere özgü bir mikroRNA olan ve HCV replikasyonuna yardımcı miRNA-122 için bağlanma bölgeleri gösterilmiştir (20). 5' kodlanmayan bölge 3011 kodondan oluşan tek büyük açık okuma penceresinin (ORF) translasyonu yönetmektedir. Bu ORF içerisinde kodlanan genler ve ilgili proteinler şekilde gösterilmiştir (Şekil 3) (18).



Şekil 3. HCV genomu ve gen ekspresyonları (18).

Translasyon ve Proteolitik İşlemler

HCV ORF'nin IRES aracılı translasyonu sonucunda, hücresel ve viral proteazlar ile kotranslasyonel ve posttranslasyonel işlenerek olgun hale getirilen yapısal ve yapısal olmayan proteinler oluşmaktadır (22).

Yapısal Proteinlerin Özellikleri

HCV; kapsid ya da kor proteini olan C proteini ve zarf glikoproteinleri olan E1 ve E2 glikoproteinleri olmak üzere iki çeşit yapısal protein içermektedir. Genomda

yapısal protein bölgesinin hemen yanında bulunan integral membran p7 proteininin yapısal ya da yapısal olmayan protein olduğu netlik kazanmamıştır (18).

C proteini ilk sentezlenen poliproteinden iki aşamalı proteoliz işlemi ile oluşturulmaktadır. HCV genomu ile birleşerek nükleokapsidi oluşturma işlevinin yanı sıra hücrel transformasyon, apoptoz ve transkripsiyonel kontrol gibi birçok hücrel yolak ile ilişkili olduğu bilinmektedir (18).

E1 ve E2 glikoproteinlerinin HCV'nin konak hücre membranına tutunma ve füzyonuna aracılık etmeleri muhtemeldir. Bu glikoproteinlerin sınıf II füzyon proteinleri gibi işlev gördükleri düşünülmektedir ancak yapısal bilgi yetersizdir. Zarf glikoproteinleri viral nötralizasyona öncülük edebilen önemli humoral antijenik yapılardır. E1 ve E2 glikoproteinlerinin dış kısımlarında sırasıyla 2 ve 3 immünojenik alt birim bulunduğu gösterilmiştir (18).

Virion yapısı ile ilişkisi kesin olmayan p7 proteini infektivite için esansiyeldir. İn vitro deneylerde p7 proteininin katyonlara geçirgen membran kanalları oluşturduğu gösterilmiştir ancak bu aktivitenin HCV yaşam döngüsünde ne gibi bir rolünün olduğu halen netlik kazanmamıştır (18).

Yapısal Olmayan Proteinlerin Özellikleri

Poliprotein yapısal proteinleri oluşturan bölgesi dışında kalan kısım NS proteinleri olan NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B proteinlerini oluşturmaktadır. NS proteinleri infekte hücre içerisinde eksprese edilmekte ve virüs yaşam döngüsünün hücre içi aşamalarını düzenlemektedir (18).

NS2 proteini NS2 ile NS3'ü birbirine bağlayan çinko bağımlı bir sistein proteazın parçasıdır ve otokatalitik aktivite ile NS2/NS3 ayrılmasını sağlar. NS2 proteini virüsün toplanmasında ve salınmasında görev almaktadır (19).

NS3 proteini serin proteaz, helikaz ve nükleotid üç fosfataz aktivitesine sahiptir. Yapısal olmayan proteinler arasındaki diğer bağların yıkılmasını sağlamaktadır (19).

NS4A proteini NS3 serin proteaz aktivitesi için kofaktör görevi görmektedir. NS4B proteini ise endoplazmik retikulumda membranöz bir replikasyon kompleksi oluşturmaktadır (19).

NS5A proteini serin fosfoprotein yapısındadır. İşlevi net olarak bilinmemekle birlikte viral replikasyon ve toplanmada rol aldığı düşünülmektedir (19). NS5B proteini ise hem genomdan komplementer RNA hem de bu negatif RNA'dan pozitif polariteli RNA sentezletebilen RdRp enzim aktivitesine sahiptir (22).

RNA Replikasyonu ve Virüsün Oluşumu

HCV enfeksiyonu sırasında konak hücrede çok büyük hücre içi membran değişiklikleri meydana gelmektedir. Replikasyon bileşenlerini sitoplazmik patern tanıyan reseptörlerden, proteazlardan ve nükleazlardan koruyan membranöz ağ HCV tarafından oluşturulmaktadır. NS4B proteininin C-terminal kısmı esas olarak endoplazmik retikulum kaynaklı membranöz ağ oluşumundan sorumludur (20).

HCV RNA replikasyonu genomla aynı uzunlukta negatif RNA ipliğinin sentezi ile başlar. Negatif iplikler kısmi çift iplikli replikatif ara ürünler ya da tam çift iplikli replikatif şekilde bulunmaktadır. Oluşan negatif iplik yaklaşık 1/10 oranında olacak şekilde birçok pozitif ipliğin sentezlenmesi için kalıp oluşturur. Hücre kültürlerinde HCV ile enfekte hücrelerin her birinde yaklaşık 100 negatif iplik, 1000 pozitif iplik ve her viral proteinden 1,000,000 kopya bulunduğu gösterilmiştir (18).

HCV partikülleri doğrudan endoplazmik retikulum içine tomurcuklanır, sekretuar yolağı geçerek hücre yüzeyinden salınırlar. HCV partiküllerinin toplanması muhtemelen viral RNA ile C-proteini arasındaki etkileşimle başlamaktadır (18). Yapısal olmayan proteinlerden NS5A transkripsiyon, replikasyon ve toplanma arasında viral RNA'yı membrana bağlayarak ve yağ damlacıklarındaki viral toplanma bölgeleri ile replikasyon kompleksi arasında fiziksel bir bağ oluşturarak moleküler bir anahtar rolü oynamaktadır. Yağ damlacıkları ve çok düşük dansiteli lipoprotein yolağının HCV toplanması ve salınmasında merkezi role sahip olduğu gösterilmiştir. Apolipoprotein B, apolipoprotein C1 ve apolipoprotein E HCV virionlarında bulunmaktadır (22).

HCV PATOFİZYOLOJİSİ

Karaciğerin Kronik İnflamatuvar Lezyonlarının Patofizyolojisi

Biyokimyasal değerleri normal olan asemptomatik HCV enfeksiyonlu bireylerde dahi kronik hepatitten hepatoselüler karsinoma kadar geniş bir yelpazede karaciğer hasarı görülebilmektedir (23).

Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğer lezyonlarının oluşmasına ve ilerlemesine sebep olan mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. HCV viral yükü ile karaciğer hastalığının ciddiyeti ve prognozu arasında ilişki bulunmaması HCV'nin sitopatik olmadığını düşündürmektedir. HCV'nin doğrudan patolojik etkisi ile ilişkilendirilebilen tek lezyon hepatositlerde lipid birikimi ile ortaya çıkan steatozdur. Sadece HCV genotip 3 ile enfekte hastalarda doğrudan virüs aracılıklı steatoz oluşurken diğer genotiplerle enfekte hastalarda steatoz metabolik faktörlerle ilişkilendirilmektedir (24).

Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğer hasarı portal lenfoid infiltrasyon, fokal ve köprüleşme nekrozları ve dejeneratif lobüler lezyonlar ile karakterizedir. Bu lezyonlar adezyon molekülleri ve kemokinler tarafından karaciğere toplanan T hücreleri ile oluşan lokal immün yanıtı bağı olarak oluşmaktadır. Lenfoid infiltratı esas olarak periportal aralıkta bulunan CD4+ tip 1 yardımcı T hücreleri ile periportal ve lobüler alanlarda yer alan CD8+ T hücrelerden meydana gelmektedir. Karaciğer lezyonlarının ciddiyeti tip 1 yardımcı T hücreleri ile ilişkili sitokinlerin bölgesel ekspresyonu ile ilişkilidir. Tümör nekroz faktör α , *fas* ve perforin aracılı mekanizmalar ile enfekte hücreleri ve etrafındaki hücreleri apoptoza uğratan sitotoksik T hücre yanıtı da karaciğer hasarında önemli role sahiptir (24).

Fibrozis Gelişim Mekanizması

Fibrozis kronik HCV enfeksiyonunun ana komplikasyonudur ve kronik HCV enfeksiyonu ilişkili morbidite ve mortalitenin de esas sorumlusudur (24).

Fibrozis, karaciğer hücrelerinin kronik hasarı ve bölgesel sitokin ve büyüme faktörlerinin salgılanması ile seyreden kronik karaciğer inflamasyonu sonucunda oluşmaktadır. Perisinüzoidal boşluklarda yer alan hepatik stellat hücreler bu

oluşumunda önemli role sahiptir. HCV enfeksiyonu esnasında karaciğer inflamasyonu ve hücre hasarı ile ilişkili olarak stellat hücreler aktiflenmektedir. HCV eradikasyonu stellat hücrelerinin deaktivasyon veya apoptoz ile ortadan kalkmasına yol açarak fibrotik evrenin gerilemesini sağlamaktadır (24).

Fibrozis oluşumunda viral faktörlerin rolü net değildir. Aksine siroza ilerleyen fibrozis gelişiminde dış etkenlerin rolü büyüktür. En önemli dış etken ılımlı düzeylerde dahi etkili olan kronik alkol kullanımıdır. HIV ve diğer hepatit virüsleri ile ko-enfeksiyon, diyabet, obezite ve immün baskılanma yaratan çeşitli durumlar da fibrozis oluşumunu şiddetlendiren diğer faktörlerdir (24).

Hepatoselüler Karsinom Gelişimi

HCV enfeksiyonunun en önemli komplikasyonu olan hepatoselüler karsinom HCV ilişkili sirozda %1-4 oranında görülmektedir. Hepatoselüler karsinom için esas risk faktörü siroz olmakla birlikte kronik alkol kullanımı, viral ko-enfeksiyon varlığı, diyabet ve obezite gibi dış etkenlerin de karsinom oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (24).

HCV enfeksiyonu ile ilişkili hepatoselüler karsinom gelişiminde ana hipotez kronik karaciğer hasarına bağlı olarak gelişen dejenerasyon ve fibrozisi takiben oluşan siroz zemininde karsinom oluşmasıdır. HCV yaşam döngüsünü sitoplazmada tamamlayan bir RNA virüsü olduğu için konak hücre genomuna entegrasyonu söz konusu değildir (25).

Kor proteini, NS3, NS4B ve NS5A proteinlerinin tek başlarına veya onkogenlerle birlikte birçok hücre serisinde transformasyona yol açtığı in vitro olarak gösterilmiştir. Ancak transformasyona yol açan mekanizma net olarak aydınlatılamamıştır (24).

HCV KLİNİĞİ

Akut Hepatit C Enfeksiyonu

Akut HCV enfeksiyonunun en iyi şekilde ortaya konduğu transfüzyon ilişkili hepatitlerde %70-80 olgu asemptomatiktir. Akut HCV enfeksiyonlu erişkin

hastaların %20-30'u klinik belirti vermektedir. Belirtili dönem maruziyet sonrası 3-12. haftalar arasındadır. Halsizlik, iştahsızlık ve sarılık gibi belirtiler görülebilmektedir. Hepatosit nekrozunu gösteren alanin amino transferaz (ALT) yüksekliği maruziyet sonrası 2. haftadan 8. haftaya kadar devam eder ve normal değerin üst sınırınının 10 katına kadar çıkabilmektedir. HCV-RNA maruziyet sonrası 1-2. haftalarda serumda tespit edilebilmektedir. HCV-RNA düzeyi ilk birkaç haftada hızla yükselmekte ve ALT yüksekliği ve belirtilerin ortaya çıkmasından hemen önce pik yaparak 10^5 - 10^7 IU/mL düzeylerine ulaşmaktadır. Kendi kendini sınırlayan akut HCV enfeksiyonunda belirtiler haftalarca sürebilmektedir. ALT ve HCV-RNA düzeylerinin düşmesi ile birlikte belirtiler gerilemektedir (26).

Akut HCV enfeksiyonu ciddi klinik tablo oluşturabilmekle birlikte fulminant karaciğer yetmezliği nadiren görülmektedir. HCV'ye karşı oluşan antikolar belirtilerin görülmeye başladığı 1-3. aylar arasında tespit edilebilmektedir. Ancak belirtili hastaların %30'unda antikor pozitifliği tespit edilemediği için akut HCV enfeksiyonu tanısında anti HCV antikor testlerinin güvenilirliği düşüktür. Üçüncü aydan sonra ise %90'ın üzerinde hastada anti HCV antikor pozitifliği saptanmaktadır (26).

Kronik Hepatit C Enfeksiyonu

Kronik hepatit C enfeksiyonu; akut enfeksiyonun başlangıcından sonra en az 6 ay süreyle kanda HCV-RNA'nın pozitif olması ile ortaya konmaktadır. HCV enfeksiyonu HCV-RNA'nın kanda tespit edilemez düzeylere indiği ve ALT düzeylerinin normale döndüğü %15-25 hastada kendi kendini sınırlandırmaktadır. Geri kalan %75-85 hasta virüsü 6 aylık dönemde kandan temizleyememekte ve kronik hepatit gelişmektedir (26).

HCV enfeksiyonunun seyri ve klinik şekli etkenle karşılaşma yaşı, cinsiyet, ırk, HIV veya HBV ko-enfeksiyonu, alkol kullanımı, diyabet gibi konakla ilişkili birçok faktöre bağlıdır (27).

Kronik HCV enfeksiyonu karaciğer hastalığı ileri evrelere ulaşmadan özgün belirtiler vermemektedir. Kronik fazda hastaların %30-70'inde belirti yoktur ya da

özgün değildir. Baskın olan belirti halsizliktir. Bununla birlikte artralji, miyalji, parestezi, kaşıntı, kuruluk sendromu, depresyon, bulantı, anoreksi ve hazımsızlık sık görülen özgün olmayan belirtilerdir. Belirtiler ile karaciğer hastalığının şiddeti arasında ilişki bulunmamaktadır (28).

HCV enfeksiyonunda ALT düzeyleri dalgalanma göstermektedir veya hafifçe artmış olarak görülebilmektedir. Hastaların yaklaşık üçte birinde serum ALT düzeyleri inatçı viremiye rağmen normal seyretmektedir (28).

HCV Enfeksiyonunda Doğal Seyir

Akut HCV enfeksiyonlu hastaların %49-91'i kronik HCV enfeksiyonuna ilerlemektedir. Transfüzyon ilişkili HCV enfeksiyonu olan hastalarda yapılan uzun dönemli çalışmalarda spontan iyileşme %15-23 oranında gerçekleşirken, hastaların %40-73'ünde kronikleşme, %15-23'ünde siroza ilerleme görülmektedir. Yirmi beş yıllık takip sonucunda karaciğer ile ilişkili mortalite oranı %4'tür. Aynı grupta yapılan çalışmalarda enfeksiyonun başlangıcı ile kronik hepatit, siroz ve HCC gelişmesi arasında geçen süre sırasıyla yaklaşık 10, 20 ve 30 yıl olarak bulunmuştur (29).

Kronik HCV enfeksiyonu kısıtlı morbidite ve mortalite ile yaklaşık iki dekat devam ederken sorunlar daha çok enfeksiyon sonrası üçüncü ve dördüncü dekatta belirginleşmektedir. Ancak karaciğer hasarı ve fibrozisin ilerlemesi zamanla doğru orantılı değildir. Hastalığın ilerlemesinde alkol kullanımı çok önemli bir risk faktörü iken demir birikimi, karaciğer yağlanması ve metabolik bozukluklar gibi birçok ek faktör de ilerlemeyi etkilemektedir. Hastalık tüm enfekte bireyler arasında %15'i geçmeyen bir grupta yaşam kalitesini ve/veya süresini düşürmektedir (29).

HCV Enfeksiyonunda Karaciğer Dışı Tutulumlar

HCV ile enfekte bireylerin yaklaşık %1-2'si karaciğer dışı organ tutulumları göstermektedir. Bu organ tutulumları renal, dermatolojik, hematolojik veya romatolojik olabilmektedir (26).

HCV enfeksiyonunda görülen en sık karaciğer dışı tutulum miks tip kriyoglobulinemidir. Kronik HCV enfeksiyonlu hastaların %50'sinde kriyoglobulinler bulunmaktadır. Yine HCV enfeksiyonlu hastalarla yapılan bir kohort çalışmasında kriyoglobulinemi sağlıklı kontrol grubuna göre 11 kat daha sık olarak bulunmuştur. Miks tip kriyoglobulinemili HCV hastalarının sadece %25-30'u klinik belirti vermektedir. Bu belirtiler arasında halsizlik, deri döküntüleri, purpura, artralji, Raynaud fenomeni, vaskülit, renal hastalık ve periferik nöropatiler sayılabilmektedir. Bu klinik tutulumlara çeşitli organlarda immün komplekslerin birikiminin sebep olduğu düşünülmektedir (26).

Kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda diğer sık görülen karaciğer dışı tutulumlar membranoproliferatif glomerülonefrit, porfıria kutaneous tarda, liken planus ve vitiligoyu içermektedir. HCV enfeksiyonu ile Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfoma, otoimmün tiroidit, Sjögren sendromu ve seronegatif artritler arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır ancak bu hastalıkların sebebinin doğrudan HCV enfeksiyonu mu yoksa kronik enfeksiyonla ilişkili immün stimülasyon mu olduğu net değildir (26).

HCV LABORATUVAR TANISI

HCV enfeksiyonunun tanısında ve daha da önemlisi tedavi kararı ve tedaviye yanıtın takibinde virolojik testlerden yararlanılmaktadır. Bu amaçla serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (30).

Serolojik Yöntemler

HCV'ye karşı oluşan antikorların tespiti

HCV'ye karşı oluşan antikorlar, çeşitli HCV epitoplarına karşı oluşan birçok antikor tespit eden üçüncü kuşak enzim immün assay (EIA) testleri ile aranmaktadır. EIA yöntemlerinin yüksek performansı immünoblot testlerinin bu amaçla kullanımını azaltmıştır. Kanda dolaşan antikorları yakalamak için rekombinant antijenler kullanılmaktadır. Anti-HCV antikorları için EIA yöntemlerinin özgüllüğü %99'un üzerindedir ancak kıyaslanabilecek bir altın standart yöntem bulunmadığı için duyarlılığını saptamak güçtür (30).

HCV genotipinin serolojik yöntemlerle tayini

HCV'nin genotipi, genotipe özgü bölgelere karşı oluşan antikorları arayan yarışmalı EIA yöntemleri ile tespit edilebilmektedir. Kronik enfekte immünkompetan hastalarda %90'a yaklaşan oranlarda anlamlı sonuç elde edilmektedir. Farklı genotipteki virüslerle enfeksiyona bağlı olarak veya çapraz reaksiyonlar sonucunda karışık sonuçlar alınabilmektedir (30).

Moleküler Yöntemler

HCV-RNA'nın kalitatif veya kantitatif olarak tespiti

HCV-RNA moleküler yöntemler ile kalitatif veya kantitatif olarak tespit edilebilmektedir.

HCV-RNA'nın kalitatif olarak tespiti için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) veya transkripsiyon aracılı amplifikasyon gibi hedef amplifikasyon sistemleri kullanılmaktadır. PCR yöntemlerinin tespit sınırı 50 IU/mL düzeylerindedir ve tüm genotipler için eşit duyarlılığa sahiptir. Real time PCR yöntemleri ile bu düzey 5-30 IU/mL düzeylerine inmektedir (30).

HCV-RNA'nın kantitasyonu için hedef amplifikasyon sistemlerinin yanı sıra sinyal amplifikasyon tekniklerinden de faydalanılmaktadır. Kandaki HCV-RNA'nın düzeyi tedaviye cevap olasılığını öngörmeye ve tedaviye yanıtın takibinde kullanışlıdır (31).

HCV genotipinin moleküler yöntemler ile tayini

HCV genotipinin tanımlanmasında referans yöntem NS5B veya E1 gen bölgelerinin direkt sekanslanması ve takiben prototip sekanslar ve filogenetik analizlerle dizi analizinin yapılmasıdır. Bu teknikler subtiplerin de ortaya konmasını gerektiren moleküler epidemiyoloji çalışmalarında kullanılmalıdır. Klinik pratikte ise 5' kodlanmayan bölgenin direkt sekans analizi veya genotip spesifik problemlerle ters hibridasyon analizi temelindeki ticari kitler kullanılmaktadır. Bu tekniklerle yanlış tiplendirme nadirken alt tiplerin tanımlanmasında %10-25 düzeylerinde hata görülebilmektedir. Ancak tedavi kararında alt tipler dikkate alınmadığı için bu hataların klinik önemi yoktur (30).

HCV Enfeksiyonunda Tanısal Yaklaşım

Kronik HCV enfeksiyonu şüphesi olan hastalarda öncelikle anti-HCV antikorları aranmalıdır. Pozitif anti-HCV testi olan hastalarda HCV-RNA araştırılmalıdır. Antiviral tedavi düşünülen hastalarda ise kantitatif bir yöntemle HCV-RNA test edilmelidir. Tedavi başlanacak olan tüm hastalarda tedavi süresine karar vermek ve tedaviye yanıt alma olasılığını öngörmek için HCV genotipi ortaya konmalıdır. Ayrıca açıklanamayan karaciğer hastalığı bulunup anti-HCV testi negatif ve immüdüşkün olan hastalarda veya akut HCV enfeksiyonu şüphesinde de HCV-RNA testi yapılmalıdır (31).

HCV TEDAVİSİ VE TEDAVİYE DİRENÇ

HCV Tedavisi

Siroz ve HCC gibi ciddi komplikasyonları olması sebebi ile HCV enfeksiyonu olan hastaların birçoğu için tedavi önerilmektedir. Tedavide amaç hastalıkla ilgili komplikasyonlardan korunmak için virüsün eradikasyonudur (32). Tedavi süresinde ve sonrasında oluşabilecek virolojik yanıtlar tabloda özetlenmiştir (Tablo 1) (33).

Tablo 1. Virolojik yanıtla ilgili tanımlamalar (33).

<i>Virolojik Yanıt</i>	<i>Zaman (hafta)</i>	<i>HCV-RNA Durumu</i>
Hızlı virolojik yanıt (RVR)	4.	Negatif
Genişletilmiş RVR (eRVR)	4-12. (boceprevir) 8-24. (telaprevir)	Negatif Negatif
Erken virolojik yanıt (EVR)	12.	Negatif (tam EVR) $\geq 2\log_{10}$ düşüş (kısmi EVR)
Tedavi sonu yanıtı (ETR)	48.	Negatif
Kalıcı virolojik yanıt (SVR)	72.	Negatif
SVR-12	60.	Negatif

Kronik HCV enfeksiyonu glikoprotein yapısındaki interferon alfa ile tedavi edilmektedir. Virüse karşı immün yanıtı etkin bir şekilde arttırdığı için tedavinin omurgasını oluşturmaktadır. Sonrasında ribavirin ile kombine tedavi altın standart halini almıştır. Günümüzde interferon pegile edilmiş formda kullanılmaktadır (34).

Pegilasyon işlemi polietilen glikol zincirlerinin ilaç molekülüne kovalent olarak bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Bu işlem sayesinde hem ilacın molekül büyüklüğünün artmasıyla böbrekten atılımı azalır ve etki süresi uzar hem de immünojenitesi azalır. Biri 40 kDa peginterferon alfa-2a ve diğeri 12 kDa peginterferon alfa-2b olmak üzere kullanım için onay almış iki pegile interferon formu bulunmaktadır. Standart interferona göre pegile interferon daha yüksek kalıcı virolojik yanıt (SVR) oranlarına sahiptir. Monoterapi olarak kullanıldığında ise standart veya pegile ayırımı olmaksızın interferon ribavirine üstündür (32).

Bir nükleozid analogu olan ribavirin RNA parçalarının oluşumunu ve uzamasını engelleyerek protein sentezini ve replikasyonu durdurmaktadır. Ribavirin doza bağımlı olarak HCV enfektivitesini inhibe etmektedir. Ancak tek başına kullanıldığında SVR gelişmemektedir (32).

Standart tedavi dozu peginterferon alfa-2a için haftada 180 µg, peginterferon alfa-2b için haftada 1.5 µg/kg, ribavirin için ise 75 kg altında 1000 mg/gün, 75 kg üstünde ise 1200 mg/gündür. HCV genotip 2 veya 3 ile enfekte hastalarda ise ribavirin dozu kilodan bağımsız olarak 800 mg/gündür (35).

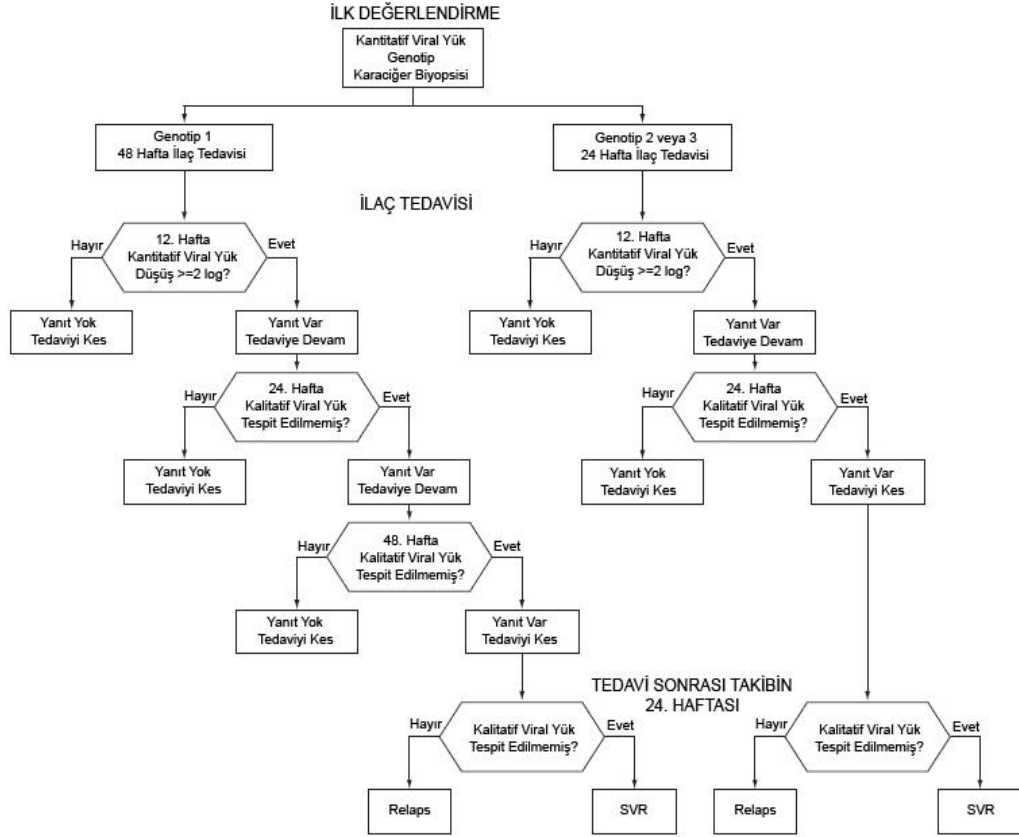
Tedavi süresinin kararı da genotipe bağılı olarak verilmektedir. HCV genotip 1 ile enfekte hastalarda tedavi süresi 48 hafta iken tip 2 veya 3 ile enfekte hastalarda 24 hafta SVR elde etmek için yeterlidir. Kronik HCV enfeksiyonunda tedavi algoritması şekilde gösterilmiştir (Şekil 4) (35).

HCV Enfeksiyonunda Tedaviye Direnç

Standart peginterferon ve ribavirin tedavisi ile kronik HCV enfeksiyonlu hastaların ancak %55'inde SVR görülmektedir. Tedavi başarısızlığında viral faktörler ve konak faktörleri birlikte etki etmektedirler (36).

Virüsün kodladığı yapısal ve yapısal olmayan proteinler direkt olarak doğal immüniteyi inhibe ederken T hücre proliferasyonunu inhibe ederek kazanılmış immüniteyi de etkisiz hale getirmektedir. Hata yapmaya yatkın RNA polimerazı

sayesinde de HCV yüksek mutasyon oranlarıyla kendisini kazanılmış immüniteden korumaktadır (36).



Şekil 4. Kronik HCV enfeksiyonunda tedavi algoritması (35).

İrk ve yaş gibi sabit konak faktörleri tedaviye yanıtı ile ilişkili bulunmuştur. Bu faktörlerden en belirgin olan ırk ile ilgili yapılan çalışmalarda Afro-Amerikan ırkta ve beyaz Amerikan ırkta SVR oranları sırasıyla %19-28 ve %39-52'dir (36). Tedaviye yanıt 40 yaş altındaki hastalarda yaşlılara göre daha iyidir. Özellikle genç bayanlar tedaviye iyi cevap vermektedir (34).

Değişken konak faktörleri de tedaviye yanıtı ile ilişkilidir. Bu faktörler arasında obezite, insülin direnci ve karaciğer yağlanması bulunmaktadır. Virahep-C kohortunda insülin direncinin bir göstergesi olan homeostaz model değerlendirmesi (HOMA) indeksi bağımsız olarak SVR ile ilişkili bulunmuştur. HOMA skoru normal (<2) olan hastalarda SVR görülme oranı %60 iken, ılımlı insülin direnci olan

(HOMA 2-4) hastalarda SVR görülme oranı %40, ciddi insülin direnci olan (HOMA> 4) hastalarda ise SVR görülme oranı %20 olarak bulunmuştur (36).

KEMOKİNLER VE KEMOKİN RESEPTÖRLERİ

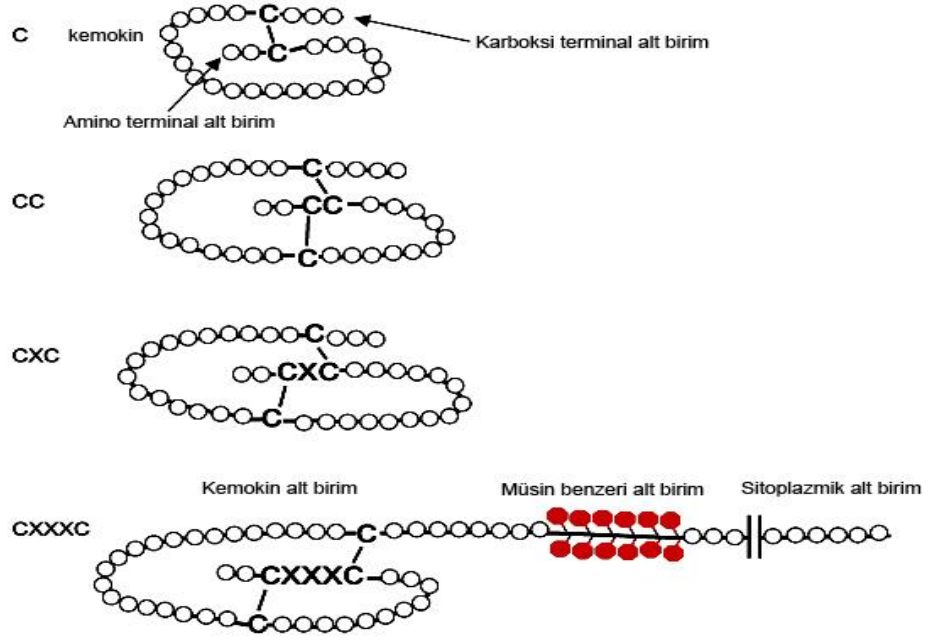
Kemokinler ya da kemotaktik sitokinler lökositler, endotel ve epitel hücrelerinin migrasyonunu sağlayan küçük molekül ağırlığına sahip molekül ailesidir (37).

Kemokinler sistein rezidülerinin pozisyonuna göre alfa kemokinler (CXC), beta kemokinler (CC), fraktalkin (CX₃C) ve lenfotaktin (C) kemokinler olmak üzere dört sınıfa ayrılmaktadırlar. İşlevlerine göre ise kemokinler homeostatik, inflamatuvar kemokinler olarak ayrılmakta veya her ikisi birlikte olabilmektedirler. Birçok fizyolojik işlevde rolü olan homeostatik kemokinler yapısal olarak eksprese edilirken inflamatuvar kemokinlerin ekspresyonu inflamatuvar uyaranlarla indüklenmektedir (37).

Kemokinlerin Moleküler Yapısı

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda insanlarda yaklaşık 50 kemokin tanımlanmıştır. Kemokinler, 8-12 kD moleküler ağırlığa sahip olmasına karşın çoklu alt birimleri bulunabilen protein yapısında moleküllerdir. Kemokin genleri spesifik lokuslarda yer almaktadırlar. CC kemokin genleri 17q11.2-12 ve CXC kemokin genleri de 4q13 lokusunda bulunmaktadırlar (38).

Moleküldeki sistein amino asidinin pozisyonuna göre; CXC, CC, C ve CX₃C şeklinde 4 alt gruba ayrılmaktadırlar. Kemokin gruplarının moleküler yapısı şekilde gösterilmiştir (Şekil 5) (39). Alfa-kemokinler, amino terminal ucundaki iki sistein arasında bir amino asit bulunduğu için CXC kemokinleri olarak tanımlanmaktadırlar. CXC kemokinler glutamat- lösin- arjinin (ELR) motifinin bulunup bulunmamasına göre de ikiye ayrılmaktadırlar. Beta-kemokinler ise uçtaki sisteinler yan yana oldukları için CC-kemokinler olarak isimlendirilirler. C kemokin olarak adlandırılan lenfotaktin tek sistein içermektedir. CX₃C kemokin ise fraktalkin veya nörotaktin olarak adlandırılmaktadır (40).



Şekil 5. Kemokinlerin moleküler yapısı (39).

Kemokin Reseptörleri

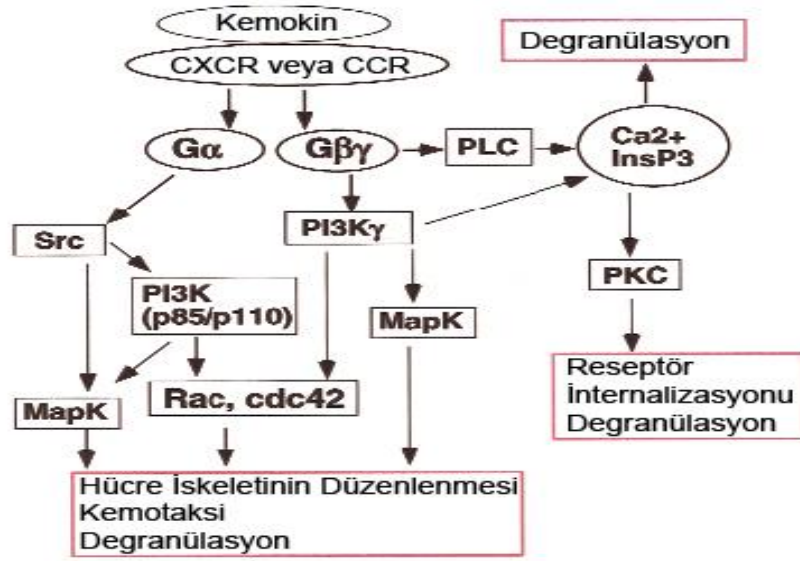
Kemokin reseptörleri GTP ile eşlenik, membrana bağlı yedi altbirimden oluşmaktadır. Kemokin reseptörlerinin büyük bir kesimi birden çok ligand ile bağlanabilmektedir ancak bu ligandların aynı kemokin alt ailesine mensup olmaları gerekmektedir (41).

Hücre yüzeyinde eksprese edilen kemokin reseptörlerinin sayısı değişkendir. Örneğin monosit ve lenfositler CCR1 ve CCR2 için hücre başına 3,000 reseptör içerirken eozinofillerin CCR3 reseptörleri için bu sayı 40,000 ile 50,000 arasında değişmektedir (41).

Tek bir hücre yüzeyinde birden çok farklı tipte kemokin reseptörü eksprese edilebilmektedir. Her biri farklı işlevleri yerine getiren bu reseptörlerin tek bir hücrede bulunabiliyor olması her reseptörün farklı sinyal yolağına sahip olduğunu göstermektedir (41).

Kemokinin reseptörüne bağlanması ile G proteini $G\alpha$ ve $G\beta\gamma$ olmak üzere iki alt birime ayrılmaktadır. $G\alpha$ alt birimi Src ailesine ait kinazları aktive ederek mitojen aktivasyonlu protein kinazlar (MAPKs) ve protein kinaz B (PKB) aktivasyonuna öncülük etmektedir. $G\beta\gamma$ alt biriminin aktivasyonu ise daha karmaşıktır ve en az üç

ayrı yolu içermektedir; fosfatidil inozitol 3 kinaz γ üzerinden MAPKs ve PKB aktivasyonu, fosfolipaz C (PLC) üzerinden protein kinaz C aktivasyonu ve Pyk-2 aktivasyonu. PLC hücre içine kalsiyum akışını artırarak nötrofil, eozinofil ve bazofil degranülasyonunu da içeren birçok hücre sel işleme aracılık etmektedir (41). Kemokin ve reseptörünün bağlanmasıyla aktiflenen yollar ve sonuçları şekilde özetlenmiştir (Şekil 6) (42).



Şekil 6. Kemokin reseptör sinyalleri (42).

Kemokin reseptörleri birden çok ligandla bağlanabilmektedir. Ancak bu ligandların aynı kemokin ailesine ait olmaları gerekmektedir. Kemokin reseptörleri, bağlanan ligandlar ve temel işlevleri tabloda özetlenmiştir (Tablo 2) (43).

Bu reseptörlerin dışında kemokinler 2 tip sinyal yaratmayan molekülle de ilişki içerisindedirler. Bunlardan ilki, eritrosit kemokin reseptör veya kemokin için Duffy antijen reseptörü (DARC) olarak bilinmektedir. İkinci tip ise heparan sülfat proteoglikan grubu moleküllerdir (44).

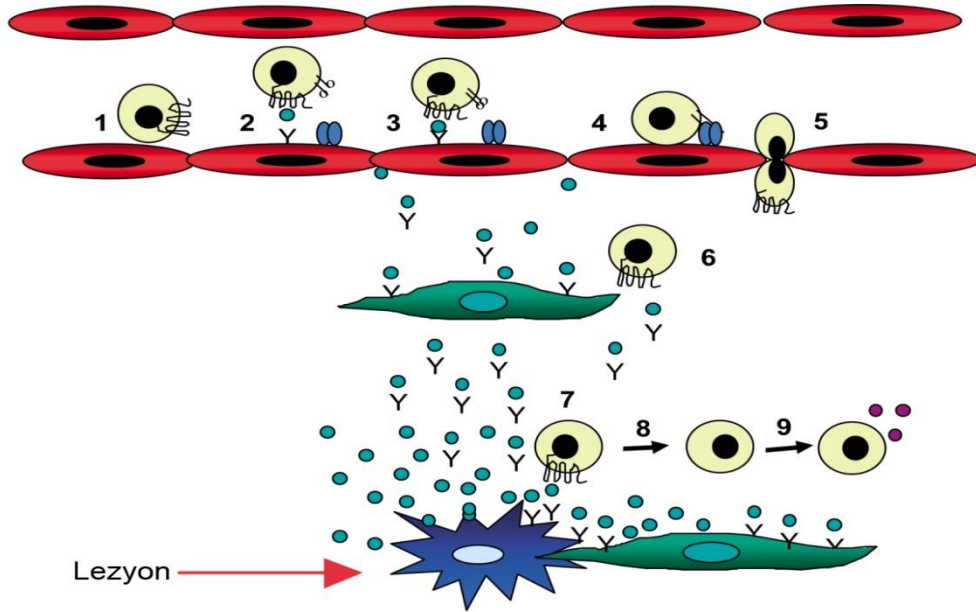
Kemokinlerin İşlevleri

Kemokinler konak savunma mekanizmasında, doğal ve kazanılmış bağışıklığın oluşumunda ve devamında hayati öneme sahiptirler. Bağışıklığa ek olarak

kemokinler yara iyileşmesi, anjiyogenez, embriyogenez, tümör gelişimi ve metastazında da rol almaktadırlar (37).

İnflamatuar kemokinler enfeksiyon, inflamasyon, doku hasarı ve tümöral dokularda efektör lökositlerin olay yerine göçünü sağlamaktadırlar. İnflamatuar sitokinlerin birçoğu hem doğal hem de kazanılmış bağışıklığın hücrelerini içeren geniş bir hücre grubunda etkilidirler (45). İnflamatuar süreçteki lökosit göçünde kemokinlerin rolü şekilde özetlenmiştir (Şekil 7) (46).

Homeostatik kemokinler ise hematopoezde kemik iliğine ve timusa, kazanılmış bağışıklığın başlangıcında dalağa ve lenf noduna ve immün sürveyansta sağlıklı dokulara lökositleri yönlendirmektedirler (45).



Şekil 7. Lökosit göçünde kemokinlerin rolü (46).

Kemokin reseptörü bulunan lökositler [1] endotelde ligandlarıyla karşılaşrlar [2]. Bağlanma integrinleri aktifler [3] lökosit adezyonu sağlanır [4]. Diapedez [5] ile damardan çıkılarak kemokin gradienti boyunca hareket edilir [6]. Lezyonun merkezinde [7] yüksek kemokin konsantrasyonu reseptörleri desensitize eder [8]. Hücreler aktive olarak proinflamatuvar mediatörler salgırlar [9].

Tablo 2. Kemokin reseptörleri ve ligandları (43).

<i>Reseptör</i>	<i>Ligand</i>	<i>Temel İşlev</i>
CXCR1	CXCL8	Nötrofil migrasyonu, doğal bağışıklık, akut inflamasyon
CXCR2	CXCL1-3, 5-8	Nötrofil migrasyonu, doğal bağışıklık, akut inflamasyon, anjiogenez
CXCR3	CXCL9-11	T hücre migrasyonu, doğal bağışıklık, Th1 inflamasyonu
CXCR4	CXCL12	B hücre lenfopoezi, kemik iliği myelopoezi, santral sinir sistemi ve vasküler gelişim, HIV enfeksiyonu
CXCR5	CXCL13	B hücre dolanımı, lenfoid gelişim
CXCR6	CXCL16	T hücre migrasyonu
CCR1	CCL3, 5, 7, 8, 13-16, 23	T hücre ve monosit migrasyonu, doğal ve kazanılmış bağışıklık, inflamasyon
CCR2	CCL2, 7, 8, 13	T hücre ve monosit migrasyonu, doğal ve kazanılmış bağışıklık, Th1 inflamasyonu
CCR3	CCL5, 7, 8, 11, 13, 15, 24, 26	Eozinofil, bazofil ve T hücre migrasyonu, alerjik inflamasyon
CCR4	CCL17, 22	T hücre ve monosit migrasyonu, alerjik inflamasyon
CCR5	CCL3-5, 8, 14	T hücre ve monosit migrasyonu, doğal ve kazanılmış bağışıklık, HIV enfeksiyonu
CCR6	CCL20	Dendritik hücre migrasyonu
CCR7	CCL19, 21	T hücre ve dendritik hücre migrasyonu, lenfoid gelişim, primer immün yanıt
CCR8	CCL1, 4, 17	T hücre dolanımı
CCR9	CCL25	Barsaklara T hücre göçü
CCR10	CCL26-28	Cilde T hücre göçü
CX₃CR1	CX ₃ CL1	T hücre ve NK hücre dolanımı ve adezyonu, doğal ve kazanılmış bağışıklık, Th1 inflamasyonu
XCR1	XCL1,2	T hücre dolanımı

Bağıışıklıkta kemokinlerin rolü

Kemokinler doğal ve kazanılmış bağıışıklıkta kilit role sahiptirler. Doğal bağıışıklığın aracıları nötrofiller, monositler, dendritik hücreler ve NK hücreleri iken naif ve hafıza CD4 ve CD8 hücreler ile immatür dendritik hücreler kazanılmış bağıışıklığa aracılık ederler. Mikrobiyal metabolizmanın yapısal elemanları ve ürünleri patojen ilişkili moleküler paternleri (PAMP) oluştururlar. PAMPlar doğal bağıışıklığın NOD1, NOD2 ve Toll benzeri reseptör (TLR) gibi patern tanıyan reseptörler (PRR) tarafından tanınmaktadır. Epitel hücreleri ve dendritik hücreler PRR sinyalizasyonu sonucunda bir dizi sitokin salgırlar. Hücre hasarı esnasında da enfeksiyöz olmayan endojen moleküller hasarla ilişkili moleküler paternler aracılığıyla TLR aktivasyonu yaparak steril inflamasyon oluşturmaktadır. TLR sinyalizasyonuyla salgılanan sitokinler otokrin ve parakrin etkilerinin yanı sıra kutuplaşmış bir sitokin profiline de yol açan (T_h1 ve T_h2) kemokin salınımını da artırmaktadır. Nekrotik hücrelerden salınan adenzin trifosfat Nrlp3 aktivasyonu ile intravasküler kemokin gradyanı oluşturarak nötrofilleri nekrotik dokuya çekmektedir (37).

Kazanılmış bağıışıklığa hem homeostatik hem de inflamatuvar kemokinler aracılık etmektedirler. Naif T hücreler, B hücreler, olgun dendritik hücreler, Langerhans hücreleri ve NK hücrelerinin sekonder lenfoid organlardaki T hücre bölgesine migrasyonu, üzerlerinde bulunan CCR7'nin CCL19 ve CCL21 ile aktivasyonu sayesinde gerçekleşmektedir (37).

B hücrelerinin CXCL13 eksprese eden lenf nodundaki foliküllere göçü, yüzeylerindeki CXCR5 sayesinde gerçekleşmektedir. Benzer şekilde immatür dendritik hücreler de inflamatuvar kemokinlerin reseptörleri olan CXCR1, CCR1, CCR2 ve CCR6'yı eksprese ederek inflamasyon alanına yönelmektedirler (37).

Yara iyileşmesinde kemokinlerin rolü

İnflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma olmak üzere üç aşamada gerçekleşen yara iyileşmesinin her aşamasında kemokinler rol almaktadır (37).

Epidermiste CXCR2 ile ligandları CXCL1 ve CXCL8 eksprese edilmektedir. CXCR2(-/-) farelerde nötrofil göçünün yetersiz olduğu, epitelizeasyonda keratinosit

proliferasyonunun ve migrasyonunun azaldığı ve yeni damar oluşumu ile yara kapanmasının geciktiği gösterilmiştir (37).

Transgenik farelerde anjiyostatik kemokin CXCL10'un ekspresyonunun inflamatuvar fazın yoğun, granülasyon fazının ise geniş ve düzensiz olması ile ilişkisi ortaya konmuştur. Bu durum yara bölgesinde yeni damar oluşumunun düzensiz bir şekilde olmasına ve yara iyileşmesinin gecikmesine yol açmaktadır (37).

CX₃CR1(-/-) farelerde makrofaj infiltrasyonu, kollajen birikimi ve yeni damar oluşumunun azalmasına bağlı olarak yara iyileşmesinin geciktiği gösterilmiştir (37).

Kemik iliği kaynaklı keratinosit öncül hücrelerinin yara bölgesine göçünü artıran CCL27 de yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (37).

Anjiyogeneizde kemokinlerin rolü

ELR “+” kemokinler olan CXCL1-3 ve CXCL5-8 pro-anjiyogenik özellikte iken ELR “-” kemokinler olan CXCL4, CXCL9-11 ve CXCL14 anjiyostatik aktiviteye sahiptir. Ayrıca DARC ELR⁺ kemokinleri sekestre ederek dolaylı yoldan anjiyogenezi inhibe etmektedir. ELR⁺ kemokinlerin endotel hücrelerindeki CXCR1 ve CXCR2'ye bağlanmasıyla endotel hücrelerinin proliferasyonu uyarılmaktadır. Ayrıca ELR “+” kemokinler kemik iliğindeki endotelial progenitör hücrelerin anjiyogenez alanına göçünü sağlamaktadır (37).

CC kemokinler de anjiyogeneizde role sahiptir. CCL2 endotelial hücrelerde bulunan CCR2'ye bağlanarak yeni damar oluşumuna aracılık etmektedir (37).

Embriyonik gelişimde kemokinlerin rolü

CX₃CR1, CCR1 ve CCR3 kemokin reseptörlerine sahip fetal trofoblastlar kemokin reseptör sinyalizasyonu sayesinde endometrium epiteline migrasyonunu gerçekleştirmektedir. Trofoblastlar ile endometrium arasındaki bu çift yönlü sinyalizasyon sayesinde embriyonun implantasyonu başarılı bir şekilde gerçekleşmektedir (37).

Kemokinlerin embriyogenezis ve merkezi sinir sistemi gelişiminde rolünün bulunduğu hayvan modellerinde gösterilmiştir. CXCR4, CXCR7 ve ligandları olan CXCL12 nöronal prekürsör hücrelerin beyindeki hedef bölgelerine yerleşimini sağlamaktadır. Yine CXCR4, CXCR7 ve CXCL12'nin primordial kök hücrenin migrasyon paternini düzenlediği de bilinmektedir (37).

CXCL12/ CXCR4 aksı kemik iliğinde lenfoid ve myeloid serinin gelişiminde, hematopoietik kök hücrelerin vasküler yayılımında ve kardiyak gelişimde de rol almaktadır (37).

Kanserde kemokinlerin rolü

Tümör gelişimi stromal ve tümöral hücrelerin ürettiği kemokinlerden etkilenmektedir. Kemokinler ve reseptörleri migrasyon, metastaz, dolaşıma karışma ve spesifik dokularda kolonize olmaları için lökositlere ve tümör hücrelerine yönlendirme işareti görevi görmektedirler. Birçok tipte kanser aşırı kemokin reseptör sinyalizasyonuna yol açacak şekilde kemokin ve kemokin reseptör aktivasyon artışına sebep olmaktadır (37).

Solid tümörler genellikle malign hücreler ve tümör büyümesi ve metastazı için önemli olan stromal hücrelerden meydana gelmektedirler. Lenfositler, makrofajlar, endotel hücreleri, fibroblastlar, eozinofiller, granülositler, B hücreleri ve NK hücreler tümör dokusundaki stromal hücreleri meydana getirmektedirler. Tümör mikroçevresi tümör dokusuna lökosit infiltrasyonunu düzenleyen yoğun CC ve CXC kemokin ağına sahiptir (37).

İnvazyon ve metastazda kemokinlerin rolü

Birçok kanser türünde CXCL12/CXCR4 ve CCL21/CCR7 aksı invazyon ve metastaz için temel faktörlerdir. Tümör hücrelerinde en sık aşırı ekspresyonu görülen kemokin reseptörü CXCR4'tür (37).

CXCR4 stromal hücre kaynaklı faktör-1 α olarak da bilinen CXCL12'ye seçici olarak bağlanmaktadır. CXCR4'ün ekspresyonu meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. CXCR4 kemotaksiyi yöneterek meme kanseri hücrelerinin invazyon

ve metastazına olanak sağlamaktadır. CXCL12 meme kanseri hücrelerinin yayıldığı lenf nodu, akciğer, karaciğer ve kemik iliği gibi dokulardaki stromal hücrelerde eksprese edilmektedir. CXCR4 ayrıca glioblastoma kanser kök hücrelerinde de gösterilmiştir (37).

Otoimmün hastalıklarda kemokinlerin rolü

İnflamatuvar sinoviyal mikroçevrede CXC ve CC kemokinler lökositlerin vasküler endotelden sinoviyaya geçişini sağlamaktadır. Romatoid artritli hastalarda CXCL8, CXCL5 ve CXCL1 serum, sinoviyal sıvı ve membranlarda en fazla bulunan ve en önemli kemokinlerdir. Sinoviyadan izole edilen makrofajların *in vitro* CXCL8 salgıladığı gösterilmiştir. Bu kemokinlere ek olarak romatoid artritte XCL1 ve CX3CL1 sinoviyal sıvıda tespit edilmiştir (37).

KEMOKİNLER İLE HEPATİT İLİŞKİSİ

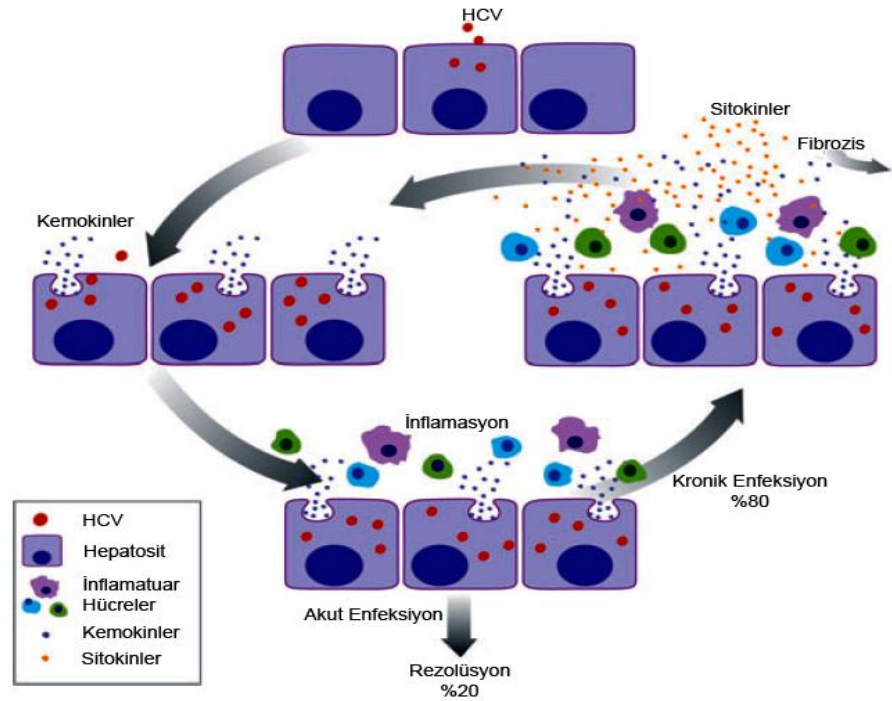
HCV enfeksiyonunda karaciğere lenfosit göçünde kemokinler oldukça önemlidirler. Enfeksiyon süresince oluşan karaciğer hasarına kemokinler öncülük etmektedirler (40).

Lenfositlerin karaciğere göçü çok basamaklı karmaşık bir süreçtir. Kemokinler ve kemokin reseptörleri bu süreçte önemli bir rol oynamaktadırlar (4).

HCV enfeksiyonunun akut döneminde spontan eradikasyonu için çeşitli viral epitoplara karşı güçlü bir CD4 ve CD8 yanıtı gerekmektedir. Virüse özgü yanıt geliştiremeyen ya da yanıtı zamanla azalan olgular kronikleşmektedirler (40).

Persistan HCV enfeksiyonu ise karaciğerde esas olarak CD8⁺ hücrelerden oluşan ve özgün olmayan inflamatuvar infiltrat ile karakterlidir. Bu hücreler intrahepatik olarak salgılanan kemokinler ve T hücreleri üzerindeki kemokin reseptörleri arasındaki etkileşim sonucunda karaciğere gelmektedirler (4). Hepatositlerdeki persistan HCV replikasyonu kemokin üretimine yol açarak inflamatuvar hücrelerin sürekli olarak karaciğere toplanmasını sağlamaktadır. Toplanan inflamatuvar hücreler de kemokin ve sitokin üretimine yol açarak sürekli bir inflamatuvar döngü oluşturmaktadırlar (Şekil 8) (40).

Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğere yardımcı T hücresi tip 1 (T_H1) ve sitotoksik T hücresi tip 1 (T_C1) fenotipindeki lenfositler baskın olarak göç etmektedir. Bu tipteki lenfositler yüzeylerinde CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptörlerini bolca eksprese etmektedirler. Karaciğerde salgılanan ELR “-” CXC kemokinler CXCR3 eksprese eden lenfositleri ortama çekerken, CC kemokinler CCR5 eksprese eden lenfositleri ortama çekmektedirler. Kronik HCV enfeksiyonunda hepatik lobül ve portal alanlarda CCR5 ve CXCR3 eksprese eden T lenfositler yoğun olarak bulunurken sağlıklı bireylerin karaciğerlerinde bu hücreler yok denecek kadar azdır (4).



Şekil 8. HCV enfeksiyonunda inflamatuvar döngü (40).

ELR “-” Kemokinler ve Hepatit C

Birçok çalışmada kronik HCV enfeksiyonu bulunan hastalarda CXCL10 ekspresyonu hem karaciğerde hem de periferik kanda artmış olarak bulunmuştur. İntrahepatik CXCL10 üretimi hepatositlerde ve sinüzoidal endotel hücrelerinde gerçekleşmektedir. Kronik hepatit C hastalarında intrahepatik CXCL10 mRNA düzeylerinin lobüler inflamasyon ile korelasyon gösterirken portal inflamasyon veya fibrozis ile ilişkili bulunmaması intralobüler T hücrelerin göçünü CXCL10’un

sağladığını göstermektedir. İnflamasyondaki rolünün yanı sıra CXCL10 antiviral tedavi yanıtının iyi bir göstergesi de olabilir. Çeşitli çalışmalarda SVR gelişen hastalarda CXCL10 düzeyleri sağlıklı bireylere eşit bulunurken, tedaviye yanıtız hastalarda yüksek olarak izlenmiştir. Tedavi öncesi CXCL10 düzeyleri de SVR gelişen hastalarda yanıtızlara göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (40).

CXCL9 ekspresyonu da kronik HCV enfeksiyonu bulunan hastalarda enfekte olmayan bireylere kıyasla karaciğerde ve periferik kanda artmış olarak bulunmuştur. Sağlıklı bireylerde ve kronik hepatit C hastalarında CXCL9 esas olarak sinüzoidal endotel hücrelerinde tespit edilirken, kronik hepatit C hastalarında CXCL9 eksprese eden hücreler inflamasyonun derecesiyle orantılı olmak üzere anlamlı şekilde artmıştır (40).

Sağlıklı insanların karaciğerinde CXCL11 ekspresyonu sinüzoidal endotel hücrelerinde baskın iken HCV enfeksiyonunda üretimin çoğu hepatositlerdedir. Çeşitli çalışmalarda kronik HCV enfeksiyonunda intrahepatik CXCL11 mRNA düzeyleri enfekte olmayan bireylere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ve bu yükseklik portal ve lobüler inflamasyon ile korelasyon göstermektedir (40).

CC Kemokinler ve Hepatit C

Karaciğerde CCL5 ekspresyonu hepatosit, sinüzoidal endotel hücreleri ve safra kanalı epitelini de içeren geniş bir hücre grubunda görülmektedir. Yapılan çalışmalarda kronik HCV enfeksiyonlu hastaların karaciğerinde CCL5 ekspresyonu artmış olarak bulunmuş ve bu artış inflamasyonun derecesi ile ilişkilendirilmiştir (40).

CCL5 üretimine müdahale etmek suretiyle HCV, kendisine karşı oluşturulan immün yanıtı kaçılabilmektedir. HCV'nin ve E2 zarf proteininin CCL5 ekspresyonunu artırdığı *in vitro* olarak gösterilmiştir. Zarf proteini E2 ile tetraspanin CD81 arasındaki ilişki sonucunda doza bağımlı olarak CCL5 salgısı indüklenmekte ve özellikle periferik CD8⁺ hücrelerde CCR5 yüzey ekspresyonu azalmaktadır. CCL5 salgısı ve CCR5 yüzey ekspresyonundaki değişiklikler karaciğere lenfosit göçünü etkileyebilmektedir (40).

Konaktaki CCL5 ve CCR5 ile ilgili genetik polimorfizmler de belirli HCV enfeksiyonlu hastalarda azalmış portal inflamasyon ve ılımlı fibrozis ile ilişkili bulunmuştur (40).

CCL3 ve CCL4'ün HCV enfeksiyonu üzerindeki etkilerini araştıran çalışmaların büyük bir kısmında kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda sağlıklı bireylere göre CCL3 ve/ veya CCL4 serum düzeylerinde artışlar görülmüştür (40).

CCR5 DELTA 32 DELESYONU

CCR5 delta 32 delesyonu; CCR5 geninin açık okuma penceresinde çerçeve kaymasına yol açan 32 baz çiftlik bir delesyondur. Bu mutasyonu homozigot olarak taşıyan bireyler hücre yüzeylerinde CCR5 eksprese edemezken, heterozigotluk fonksiyonel CCR5 proteininin ekspresyonunda azalmaya neden olmaktadır (47).

CCR5 delta 32 delesyonu HIV enfeksiyonuna karşı koruyucu olduğu için klinik önem kazanmıştır. HIV enfeksiyonu dışında delta 32 delesyonu romatoid artrit ve multipl sklerozun daha ılımlı formlarıyla ilişkili bulunmuştur. Renal transplantasyonda da delta 32 delesyonu daha uzun greft ömrü ile ilişkilendirilmiştir. Son olarak da kronik HCV enfeksiyonunda CCR5 delta 32 allelinin prevalansı artmış olarak bulunmuştur. CCR5 delta 32 homozigotluğu da artmış HCV viral yükü ile ilişkilendirilmiştir. CCR5 delta 32 delesyonuna bağlı CCR5 ekspresyonunun kaybı muhtemelen hücrel immün yanıt ile etkileşerek hepatit C'yi etkilemektedir (47).

CCR 5 delta 32 delesyonu HCV enfeksiyonunda tedavi yanıtını da etkilemektedir. Kronik HCV enfeksiyonu tedavisi alan hastalardan CCR5 delta 32 delesyonuna sahip olanlar anti HCV tedavisine oldukça düşük yanıt oranları göstermektedirler (3).

GEREÇ VE YÖNTEM

ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Hasta Grubu

Mart 2012 – Ekim 2012 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran hastalardan serolojik olarak HCV'ye karşı antikoru bulunan ve PCR ile viral yükü tespit edilen hastalar çalışmaya alındı. Ayrıca çalışma için hastalardan kanların alındığı anda poliklinik takip rutini dahilinde real time PCR ile viral yük tespiti yapıldı . Tüm viral yük ölçümleri aynı yöntem ve aynı cihazla yapıldı.

Çalışmaya katılan hasta grubu 23-73 yaşları arasında 24'ü erkek ve 32'si kadın olmak üzere toplam 56 kişiden oluşmaktaydı.

Kontrol Grubu

Kontrol grubu; hasta grubuna yaş ve cinsiyet olarak benzeyen ancak hasta grubunun özelliklerini içermeyen ve kemokinler üzerine etkisi olabilen inflamatuvar hastalıkları bulunmayan sağlıklı bireylerden oluşturuldu.

Çalışmaya katılan kontrol grubu 28-63 yaşları arasında 12'si erkek ve 16'sı kadın olmak üzere toplam 28 kişiden oluşmaktaydı.

Etik Kurul Onayı

Çalışma öncesinde Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu'nun 02.11.2010 tarih ve 07 sayılı onayı alındı. Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılara aydınlatılmış onam formları doldurularak yapılacaklar hakkında bilgi verildi.

ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılardan 1 adet vakumlu jelli tüpe ve 1 adet EDTA' lı tüpe venöz kan alındı.

Vakumlu jelli tüpe alınan kandan elde edilen serumdan ELISA çalışmalarında kullanılmak üzere 500'er µL ayrılarak -20 °C'de saklandı.

EDTA'lı tüpe alınan kandan 200 µL'lik kısmı akım sitometri çalışmalarında kullanılmak üzere alındıktan sonra kalan tam kan PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

KULLANILAN CİHAZLAR

- Akım sitometri cihazı (FACSCalibur, BD, ABD)
- Real-Time PCR cihazı (LightCycler® 2.0, Roche, ABD)
- ELISA okuyucu (ELx808, Biotek Instruments, ABD)
- Masaüstü santrifüj (NF 800, Nüve, Türkiye)
- -20°C derin dondurucu (Uğur, Türkiye)
- Ayarlanabilir otomatik pipet seti (1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)
- Çok kanallı otomatik pipet (30-300 µL, CappAero™ Multi, Capp, Almanya)

KULLANILAN SARF MALZEMELERİ

- Jelli vakumlu düz tüpler (LP Italiana, Italy)
- EDTA'lı tüpler (LP Italiana, Italy)
- 0,5 mL ve 1,5 mL'lik Eppendorf tüpler (Isolab, Almanya)
- 1-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL ve 100-1000 µL'lik pipet uçları

KULLANILAN KİTLER

- İnsan CCL3 (MIP-1α) ELISA kiti (Invitrogen, ABD)
- İnsan CCL4 (MIP-1β) ELISA kiti (Invitrogen, ABD)
- İnsan CCL5 (RANTES) ELISA kiti (Invitrogen, ABD)
- İnsan CXCL9 (MIG) ELISA kiti (Raybiotech, ABD)
- İnsan CXCL10 (IP-10) ELISA kiti (Invitrogen, ABD)
- CCR5 delta 32 delesyon kiti (Roche, ABD)

KULLANILAN ANTİKORLAR

- CCR5-Cy5 IgG2a monoklonal antikor (BD Pharmingen, ABD)
- CXCR3-CF IgG1 monoklonal antikor (LifeSpan BioSciences, ABD)
- CD8-PE monoklonal antikor (Imgenex, ABD)

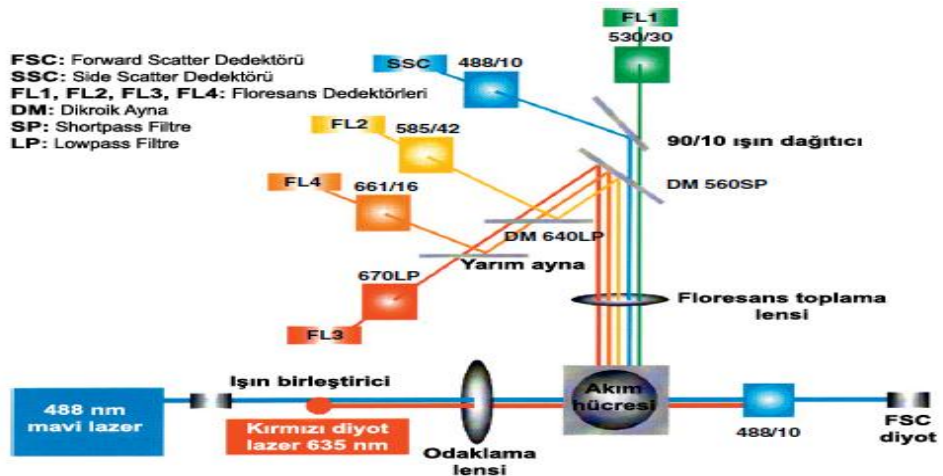
KEMOKİN RESEPTÖR DÜZEYLERİNİN TESPİT EDİLMESİ

Kemokin reseptör düzeylerinin belirlenmesi için akım sitometri tekniği kullanıldı.

Akım Sitometri Prensibi

Akım sitometri; süspansiyon halindeki hücreleri bir akış kanalından belirli bir hızda tek tek geçerken sınıflandıran sistemdir (48).

Akım sitometri hidrolik, optik ve elektrik olmak üzere 3 ayrı sistemin entegrasyonu ile oluşmaktadır. Hidrolik sistemle hücreler akım hücresine tek sıra halinde iletilmektedir. Bu geçiş farklı basınçtaki iki sıvının oluşturduğu ince kanalda gerçekleşmektedir. Optik sistemde akım hücresine ulaşan hücreler 488 nm dalga boyundaki argon ion lazer ışınları ile karşılaşmaktadırlar. Hücrelerden saçılan ve yayılan ışınlar fotodetektörler ile algılanmaktadırlar. Forward scatter (FSC) dedektörü ile hücrelerin büyüklükleri, side scatter (SSC) dedektörleri ile hücrelerin granülaritesi ve floresan dedektörleri ile belirli yapıları boyar maddelerle işaretlenmiş hücrelerin floresan yoğunluğu algılanmaktadır. Son olarak elektrik sistemi ile optik sinyaller amplifiye edilerek elektrik sinyallerine dönüştürülmekte ve bilgisayara iletilmektedir (49). Çalışmada kullanılan FACSCalibur cihazının optik sistemi şekilde gösterilmektedir (Şekil 9) (50).



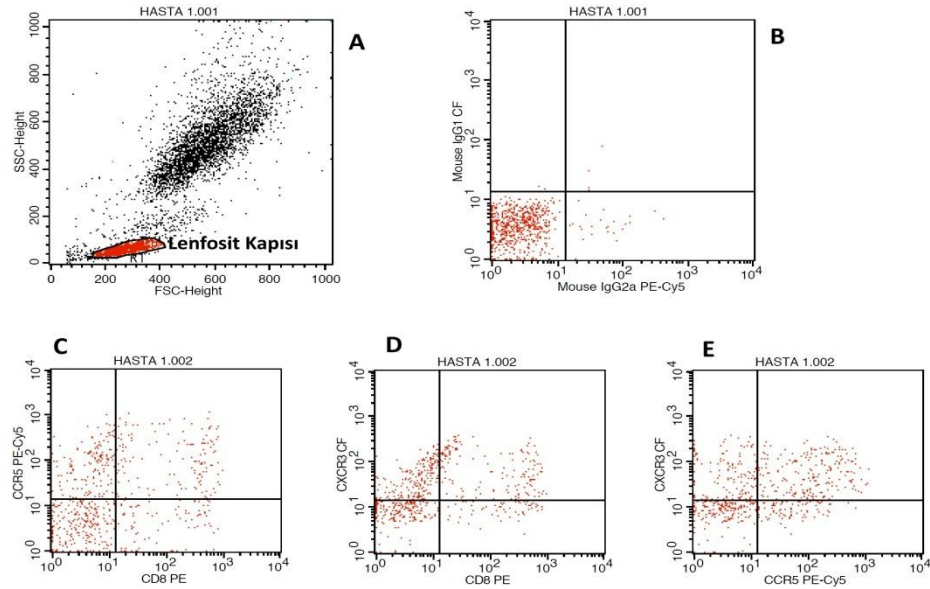
Şekil 9. FACSCalibur optik sistemi (50).

Akım Sitometri İşlem Basamakları

Akım sitometri işlemi monoklonal antikorlarla aranan antijenik yapıların işaretlenmesi, cihazda okutma ve analiz olmak üzere 3 aşamada gerçekleştirildi (51).

1. İzotip kontrol ve antikorlar için 2 adet 12x75 mm'lik falcon tüplerine 100'er μL tam kan pipetlendi.
2. İzotip kontrol tüpüne 20 μL mouse PE-Cy5 IgG2a ve 10 μL mouse CF IgG1 izotip kontrolleri eklendi.
3. Antikor tüpüne 20 μL CCR5-Cy5 IgG2a, 10 μL CXCR3-CF IgG1 ve 10 μL CD8-PE antikorları eklendi.
4. İzotip kontrol ve antikor tüpleri vortekslenerek 25 dakika karanlık ortamda ve oda ısısında inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası tüpler vortekslenerek 2 ml lizis tamponu eklendi ve tekrar vortekslendi. Oda ısısında, karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyonu takiben tüpler 300 g (1200 rpm) hızında 5 dakika santrifüj edildi.
7. Tüplerdeki sıvı kısım atılıp dip çökeltisi vortekslendi.
8. Çökeltinin üzerine 2 ml yıkama solüsyonu eklenip vortekslendi.
9. Tüpler 300 g (1200 rpm) hızında 5 dakika santrifüj edildi.
10. Tüplerdeki sıvı kısım atılıp dip çökeltisi vortekslendi.
11. 500 μL yıkama solüsyonu eklenip vortekslendi.
12. Sırasıyla izotip kontrol ve antikor tüpleri FACSCalibur cihazında okutuldu. Cihazda okutma 12 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ hızında gerçekleştirildi. Herbir tüp için 10000 olay kaydedildi.
13. Olayların kaydedilmesinde ve analizinde CellQuest Pro yazılımı kullanıldı.
14. Kaydedilen olaylar forward scatter/side scatter, IgG2a PE-Cy5/IgG1 CF, CD8 PE/CCR5 PE-Cy5, CD8 PE/CXCR3 CF ve CCR5 PE-Cy5/CXCR3 CF grafikleri ile analiz edildi. Grafikler şekilde görülmektedir (Şekil 10).
15. "Forward scatter/side scatter" grafiğinde lenfosit kapısı alındı.

16. İzotip kontroller olan IgG2a PE-Cy5/IgG1 CF grafiğinde, lenfosit kapısında negatif olan kadran belirlendi. Buna göre diğer grafiklerde kadranlar işaretlendi (Şekil 10).
17. CD8 PE/CCR5 PE-Cy5 grafiği ile CD8⁺ lenfositler üzerindeki kemokin reseptör CCR5 düzeyleri belirlendi.
18. CD8 PE/CXCR3 CF grafiği ile CD8⁺ lenfositler üzerindeki kemokin reseptör CXCR3 düzeyleri belirlendi.
19. CXCR3 CF/CCR5 PE-Cy5 grafiği ile kemokin reseptör CCR5 ve kemokin reseptör CXCR3'ü birlikte eksprese eden lenfositler belirlendi.



Şekil 10. Akım sitometri analiz grafikleri

A. Forward Scatter- Side Scatter grafiği, **B.** İzotip kontroller, **C.** CD8-CCR5 grafiği, **D.** CD8-CXCR3 grafiği, **E.** CCR5-CXCR3 grafiği

KEMOKİN LİGAND DÜZEYLERİNİN TESPİT EDİLMESİ

Kemokin ligand CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 ve CXCL10 düzeylerinin belirlenmesi için ticari ELISA kitleri kullanıldı.

CCL3, CCL4, CCL5 ve CXCL10 Reaktifleri

- Liyofilize rekombinant standartlar
- Standart dilüent tamponu
- Kontroller: 2 düzey liyofilize rekombinant human MIP-1 α (CCL3)

- Ölçülen kemokin ligandına karşı antikor ile kaplı mikrotitrasyon stripleri (her biri 8 kuyucuklu 12 adet strip)
- Biyotin ile işaretli konjugat
- Streptavidin peroksidaz (100 kat konsantre)
- Streptavidin peroksidaz dilüent
- 25x yıkama tamponu
- İnkübasyon tamponu (sadece CCL4 için mevcut)
- Stabilize kromojen: Tetrametilbenzidin
- Durdurma çözeltisi

Kitler analiz anına kadar 2-8 °C’de saklandığı için analiz öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Dondurularak saklanmış olan hasta serumları oda ısısına getirildi.

CCL3, CCL4, CCL5 ve CXCL10 ELISA kitlerinin her biri için, konsantre halde bulunan streptavidin peroksidazın 120 µL’si 12 mL streptavidin peroksidaz dilüenti ile 100 kat sulandırıldı ve kullanıma hazır streptavidin peroksidaz haline getirildi.

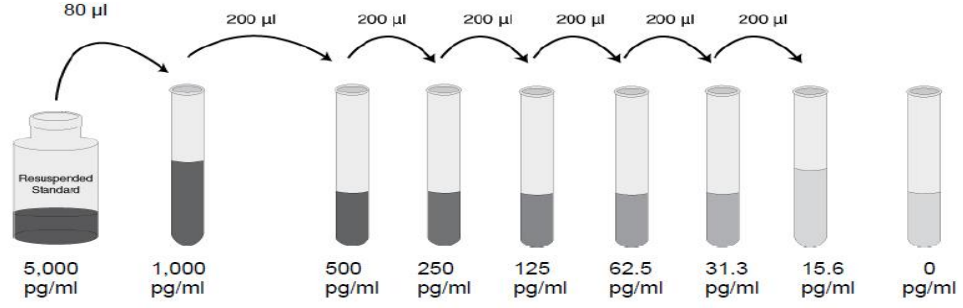
CCL3, CCL4, CCL5 ve CXCL10 ELISA kitlerine her biri için, 20 mL 25x konsantre yıkama tamponu 500 ml yıkama tamponu elde edilecek biçimde distile su ile dilüe edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

CC Kemokin Ligand 3 (CCL3, MIP-1 α)

CCL3 düzeyleri “Invitrogen Human MIP-1 α ELISA” kiti kullanılarak serumdan Sandwich ELISA yöntemi ile tespit edildi.

CCL3 standartlarının hazırlanması

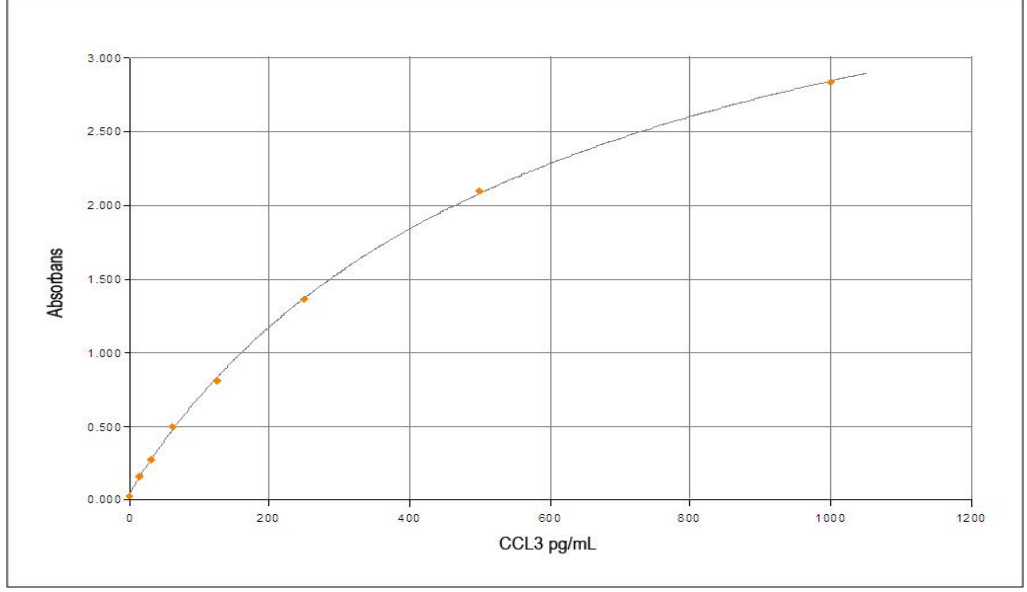
Liyofilize standart, standart dilüent tamponu ile 5000 pg/mL konsantrasyonda sulandırıldı. Bu çözeltiden 1000 pg/mL ile 15.6 pg/mL aralığında human MIP-1 α elde edilecek şekilde seri dilüsyon yapıldı (Şekil 11).



Şekil 11. CCL3 standart dilüsyonu

CCL3 çalışma basamakları

1. Sıfır standart kuyucuğuna 50 µL standart dilüent tamponu pipetlendi.
2. Standartlar, hasta serumları ve kontrollerden uygun kuyucuklara 50'şer µL pipetlendi.
3. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 50'şer µL biyotin konjugat pipetlendi ve plak hafifçe çalkalandı.
4. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
5. Kuyucuklar boşaltılıp 400 µL kullanıma hazır yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
6. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 100'er µL kullanıma hazır streptavidin peroksidaz pipetlendi.
7. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
8. Beş nolu basamak tekrar edildi
9. Tüm kuyucuklara 100'er µL stabilize kromojen pipetlendi.
10. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.
11. Tüm kuyucuklara 100'er µL durdurma çözeltisi eklendi ve hafifçe çalkalandı.
12. Tüm kuyucukların absorbansı durdurma çözeltisinin eklenmesini takiben en geç 2 saat içinde 450 nm dalga boyunda kromojen körüne karşı okutuldu.
13. Çalışılan CCL3 standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 12).
14. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki CCL3 düzeyleri belirlendi.



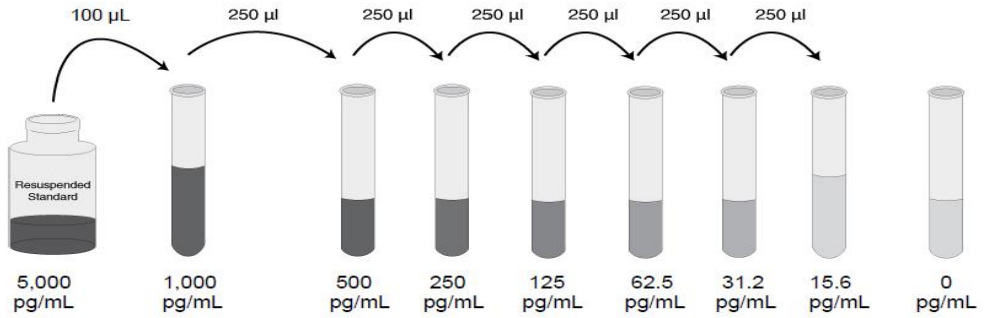
Şekil 12. CCL3 kalibrasyon eğrisi

CC Kemokin Ligand 4 (CCL4, MIP-1 β)

CCL4 düzeyleri “Invitrogen Human MIP-1 β ELISA” kiti kullanılarak serumdan Sandwich ELISA yöntemi ile tespit edildi.

CCL4 standartlarının hazırlanması

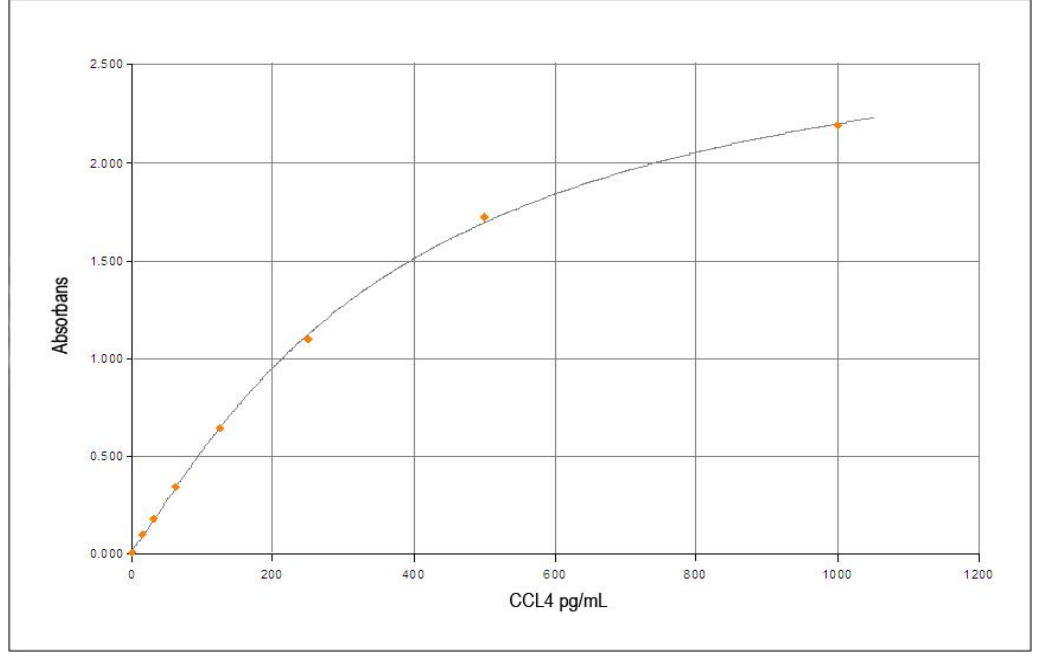
Liyofilize standart, standart dilüent tamponu ile 5000 pg/mL konsantrasyonda sulandırıldı. Bu çözeltilerden 1000 pg/mL ile 15.6 pg/mL aralığında human MIP-1 β elde edilecek şekilde seri dilüsyon yapıldı (Şekil 13).



Şekil 13. CCL4 standart dilüsyonu

CCL4 çalışma basamakları

1. Sıfır standart kuyucuğuna 50 µL standart dilüent tamponu pipetlendi.
2. Standartlar ve hasta serumlarından uygun kuyucuklara 50'şer µL pipetlendi.
3. Standartlar ve hasta serumlarının bulunduğu kuyucuklara 50'şer µL inkübasyon tamponu pipetlendi.
4. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
5. Kuyucuklar boşaltılıp 400 µL kullanıma hazır yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
6. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 100'er µL biyotin konjugat pipetlendi ve plak hafifçe çalkalandı.
7. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
8. Beş nolu basamak tekrar edildi.
9. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 100'er µL kullanıma hazır streptavidin peroksidaz pipetlendi.
10. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
11. Beş nolu basamak tekrar edildi.
12. Tüm kuyucuklara 100'er µL stabilize kromojen pipetlendi.
13. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.
14. Tüm kuyucuklara 100'er µL durdurma çözeltisi eklendi ve hafifçe çalkalandı.
15. Tüm kuyucukların absorbansı durdurma çözeltisinin eklenmesini takiben en geç 2 saat içinde 450 nm dalga boyunda kromojen körüne karşı okutuldu.
16. Çalışılan CCL4 standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 14).
17. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki CCL4 düzeyleri belirlendi.



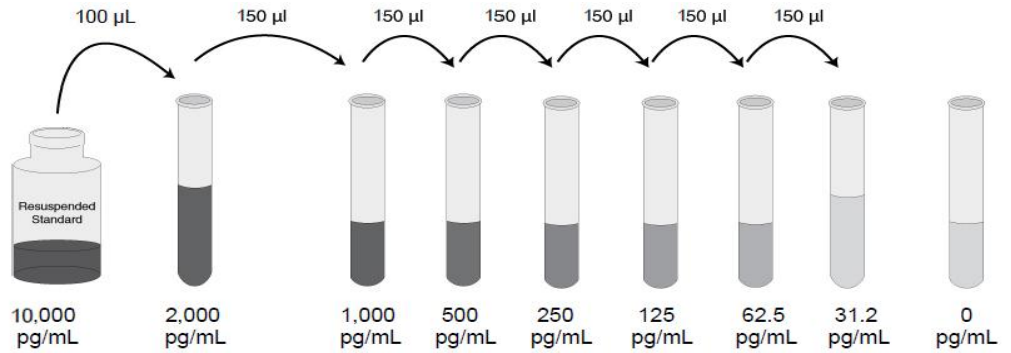
Şekil 14. CCL4 kalibrasyon eğrisi

CC Kemokin Ligand 5 (CCL5, RANTES)

CCL5 düzeyleri “Invitrogen Human RANTES ELISA” kiti kullanılarak serumdan Sandwich ELISA yöntemi ile tespit edildi.

CCL5 standartlarının hazırlanması

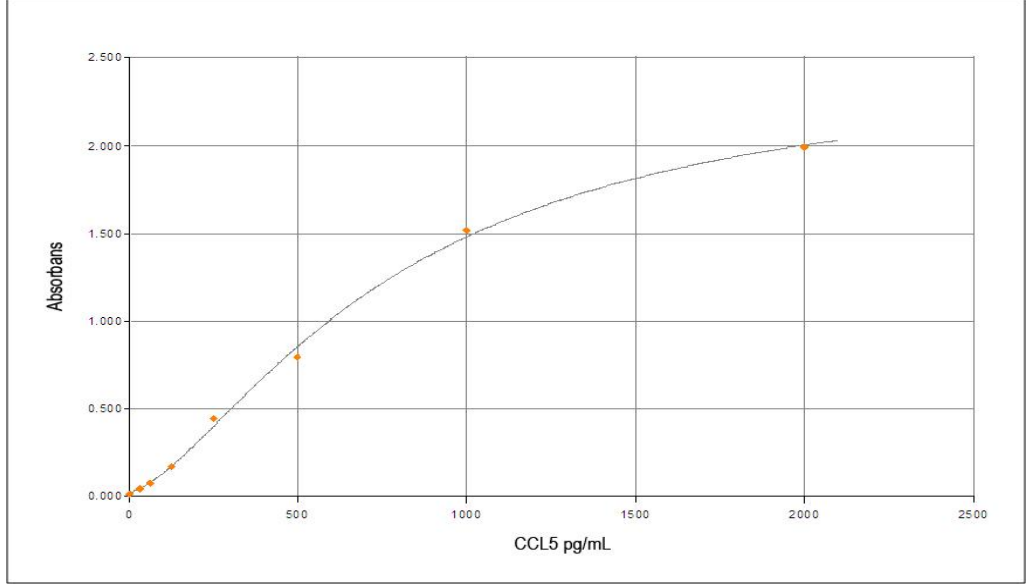
Liyofilize standart, standart dilüent tamponu ile 10000 pg/mL konsantrasyonda sulandırıldı. Bu çözeltiden 2000 pg/mL ile 31.2 pg/mL aralığında human RANTES elde edilecek şekilde seri dilüsyon yapıldı (Şekil 15).



Şekil 15. CCL5 standart dilüsyonu

CCL5 çalışma basamakları

1. Hasta serumları standart dilüent tamponu ile 50 kat dilüe edildi.
2. Sıfır standart kuyucuğuna 50 µL standart dilüent tamponu pipetlendi.
3. Standartlar ve hasta serumlarından uygun kuyucuklara 50'şer µL pipetlendi.
4. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 50'şer µL biyotin konjugat pipetlendi ve plak hafifçe çalkalandı.
5. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
6. Kuyucuklar boşaltılıp 400 µL kullanıma hazır yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
7. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 100'er µL kullanıma hazır streptavidin peroksidaz pipetlendi.
8. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
9. Altı nolu basamak tekrar edildi.
10. Tüm kuyucuklara 100'er µL stabilize kromojen pipetlendi.
11. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.
12. Tüm kuyucuklara 100'er µL durdurma çözeltisi eklendi ve hafifçe çalkalandı.
13. Tüm kuyucukların absorbansı durdurma çözeltisinin eklenmesini takiben en geç 2 saat içinde 450 nm dalga boyunda kromojen körüne karşı okutuldu.
14. Çalışılan CCL5 standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 16).
15. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak dilüe hasta serumlarındaki CCL5 düzeyleri belirlendi ve dilüsyon faktörü olan 50 ile çarpılarak gerçek CCL5 düzeyleri elde edildi.



Şekil 16. CCL5 kalibrasyon eğrisi

CXC Kemokin Ligand 9 (CXCL9, MIG)

CXCL9 düzeyleri “Raybio® Human MIG ELISA” kiti kullanılarak serumdan Sandwich ELISA yöntemi ile tespit edildi.

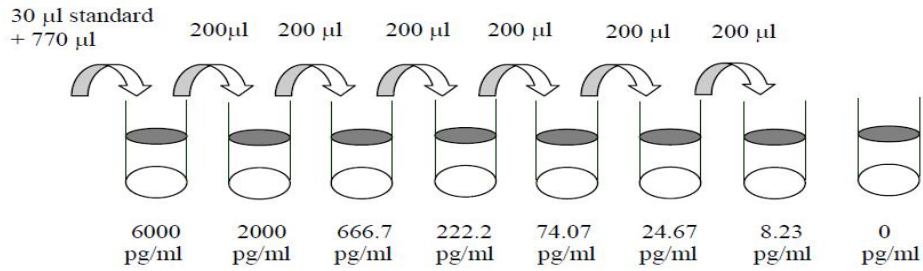
Reaktifler

- Anti-human MIG kaplı mikrotitrasyon stripleri (her biri 8 kuyucuklu 12 adet strip)
- 20x yıkama tamponu
- Standartlar: Rekombinant human MIG
- Standart dilüent tamponu (dilüent A): 1 şişe 30 mL % 0.09 sodyum azid içerir
- Dilüent B: 15 mL 5x konsantre tampon
- Konjugat: Biotin ile işaretli anti human MIG
- Streptavidin peroksidaz (20000 kat konsantre)
- Stabilize kromojen: Tetrametilbenzidin
- Durdurma çözeltisi

CXCL9 reaktiflerinin ve standartlarının hazırlanması

Dilüent B distile su ile 5 kat dilüe edildi.

Liyofilize standart, 400 μ L dilüent A ile 160 ng/mL konsantrasyonda olacak şekilde sulandırıldı. Hafifçe çalkalanarak 10 dakika bekletildi. Bu çözeltiden 30 μ L alınarak 770 μ L dilüent A içeren tüpe aktarıldı ve bu tüp 6000 pg/mL human MIG olarak etiketlendi. 2000, 666.7, 222.2, 74.07, 24.67 ve 8.23 pg/mL human MIG olarak etiketlenen 6 boş tüpe 400'er μ L dilüent A eklendi ve şekilde tariflendiği gibi 200 μ L ile seri dilüsyon yapıldı. Dilüent A tek başına 0 pg/mL standart olarak kullanıldı (Şekil 17).



Şekil 17. CXCL9 standart dilüsyonu

Konsantre halde bulunan streptavidin peroksidazın öncelikle 2 μ L'si 198 μ L 1x dilüent B ile 100 kat sulandırıldı. Bu dilüe karışımın 60 μ L'si 12 mL dilüent B ile sulandırılarak 20000 kat dilüe kullanıma hazır streptavidin peroksidaz haline getirildi.

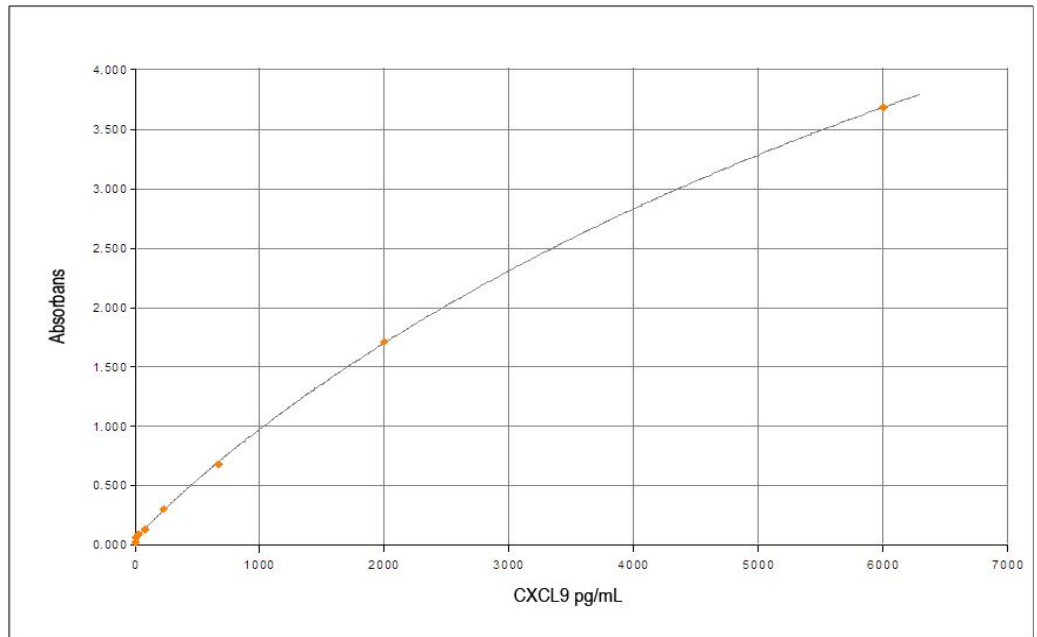
Liyofilize halde bulunan konjugat 100 μ L dilüent B ile sulandırılarak 65x konsantre konjugat haline getirildi. İşlem öncesi yine dilüent B ile 65 kat sulandırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

20 mL 20x konsantre yıkama tamponu 400 ml yıkama tamponu elde edilecek biçimde distile su ile dilüe edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

CXCL9 çalışma basamakları

1. Standartlar ve hasta serumlarından uygun kuyucuklara 100'er μ L pipetlendi. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 2.5 saat inkübe edildi.

2. Kuyucuklar boşaltılıp 300 µL kullanıma hazır yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
3. Tüm kuyucuklara 100'er µL biyotin konjugat pipetlendi. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat hafifçe çalkalanarak inkübe edildi.
4. İki nolu basamak tekrar edildi.
5. Tüm kuyucuklara 100'er µL kullanıma hazır streptavidin peroksidaz pipetlendi. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 45 dakika hafifçe çalkalanarak inkübe edildi.
6. İki nolu basamak tekrar edildi.
7. Tüm kuyucuklara 100'er µL stabilize kromojen pipetlendi. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta hafifçe çalkalanarak 30 dakika inkübe edildi.
8. Tüm kuyucuklara 50'şer µL durdurma çözeltisi eklendi ve 450 nm dalga boyunda okutuldu.
9. Çalışılan CXCL9 standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 18).
10. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki CXCL9 düzeyleri belirlendi.



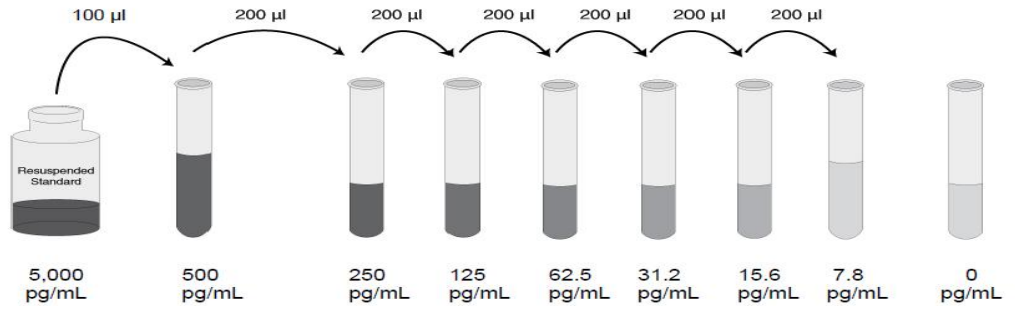
Şekil 18. CXCL9 kalibrasyon eğrisi

CXC Kemokin Ligand 10 (CXCL10, IP-10)

CXCL10 düzeyleri “Invitrogen Human IP-10 ELISA” kiti kullanılarak serumdan Sandwich ELISA yöntemi ile tespit edildi.

CXCL10 standartlarının hazırlanması

Liyofilize standart, standart dilüent tamponu ile 5000 pg/mL konsantrasyonda sulandırıldı. Bu çözeltilerden 500 pg/mL ile 7.8 pg/mL aralığında human IP-10 elde edilecek şekilde seri dilüsyon yapıldı (Şekil 19).

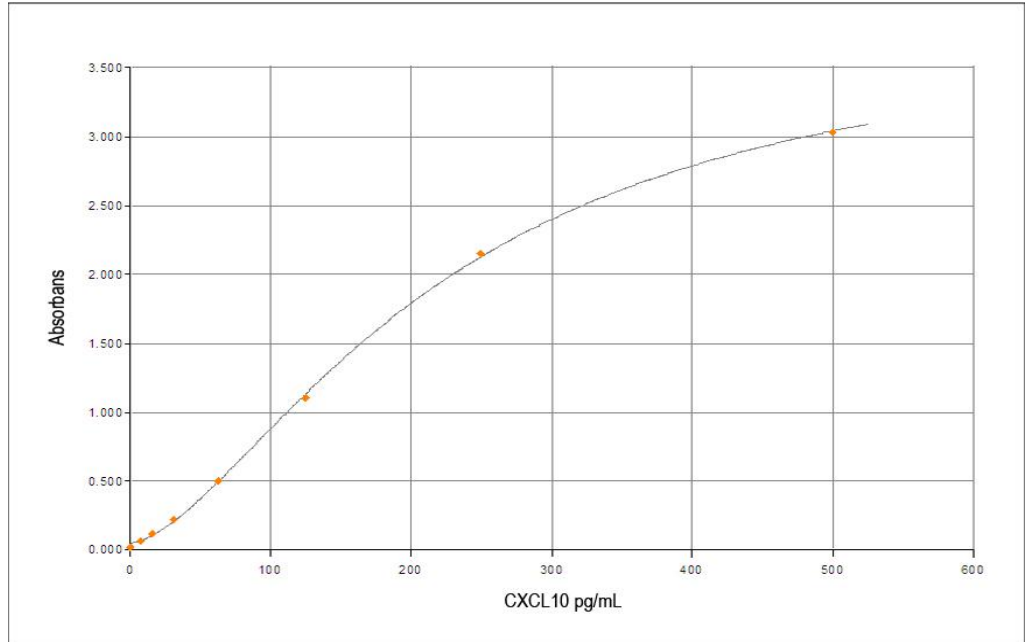


Şekil 19. CXCL10 standart dilüsyonu

CXCL10 çalışma basamakları

1. Sıfır standart kuyucuğuna 50 µL standart dilüent tamponu pipetlendi.
2. Standartlar ve hasta serumlarından uygun kuyucuklara 50'şer µL pipetlendi.
3. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 50'şer µL biyotin konjugat pipetlendi ve plak hafifçe çalkalandı.
4. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi.
5. Kuyucuklar boşaltılıp 400 µL kullanıma hazır yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
6. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 100'er µL kullanıma hazır streptavidin peroksidaz pipetlendi.
7. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
8. Beş nolu basamak tekrar edildi.
9. Tüm kuyucuklara 50'şer µL stabilize kromojen pipetlendi.
10. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.

11. Tüm kuyucuklara 100'er μL durdurma çözeltisi eklendi ve hafifçe çalkalandı.
12. Tüm kuyucukların absorbansı durdurma çözeltisinin eklenmesini takiben en geç 2 saat içinde 450 nm dalga boyunda kromojen körüne karşı okutuldu.
13. Çalışılan CXCL10 standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 20).
14. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki CXCL10 düzeyleri belirlendi.



Şekil 20. CXCL10 kalibrasyon eğrisi

CCR5 DELTA 32 DELESYONUNUN SAPTANMASI

CCR5 delta 32 delesyonunun gösterilmesi için “real time PCR” tekniği kullanıldı.

Genomik DNA'nın Elde Edilmesi

Genomik DNA, Roche® High Pure PCR Template Preparation Kit kullanılarak tam kandan elde edildi. Presipitasyon oluşumuna engel olmak amacıyla kit 15-25 °C' de saklandı.

Reaktifler

- Bağlayıcı tampon; 6 M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100, pH 4.4
- Liyofilize Proteinaz K
- İnhibitör ayırıcı tampon; 5 M guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6
- Yıkama tamponu; 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5
- Elüsyon tamponu; 10 mM Tris-HCl, pH 8.5
- Filtreli tüpler ve koleksiyon tüpleri

Reaktiflerin hazırlanması

Liyofilize proteinaz K 4.5 mL distile su ile kullanıma hazır hale getirildi. Kullanıma hazır Proteinaz K -20 °C’de saklandı.

İnhibitör ayırıcı tampon 20 mL saf etanol ile kullanıma hazır hale getirildi. Kullanıma hazır inhibitör ayırıcı tampon 15-25 °C’de saklandı.

Yıkama tamponu 80 mL saf etanol ile kullanıma hazır hale getirildi. Kullanıma hazır yıkama tamponu 15-25 °C’de saklandı.

Genomik DNA ekstraksiyon basamakları

Genomik DNA’nın ekstraksiyonu için 200 µL tam kan kullanıldı. İşlem anına kadar -20 °C’de saklanan kanlar oda sıcaklığına getirildi.

Ekstraksiyon işleminin öncesinde elüsyon tamponu ısı bloğunda 70 °C’ye kadar ısıtıldı.

Malzemeler hazırlandıktan sonra sırasıyla aşağıdaki işlemler tüm örnekler için ayrı ayrı uygulandı:

1. Nukleaz içermeyen 1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüpüne 200 µL tam kan, 200 µL bağlanma tamponu, 40 µL kullanıma hazır Proteinaz K eklendi. Karıştırılarak 70 °C’de 10 dakika inkübe edildi.
2. Karışıma 100 µL isopropanol eklendi ve karıştırıldı.

3. Bir filtrelili tp koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Karışım filtrelili tüpe pipetlendi. İ içe geçmiş tüpler 8000 g’de 1 dakika santrifüjlendi.
4. Filtrelili tp ayrılarak yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Filtrelili tüpe 500 µL inhibitör ayırıcı tampon eklendi. İ içe geçmiş tüpler 8000 g’de 1 dakika santrifüjlendi.
5. Filtrelili tp ayrılarak yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Filtrelili tüpe 500 µL yıkama tamponu eklendi. İ içe geçmiş tüpler 8000 g’de 1 dakika santrifüjlendi.
6. Filtrelili tp ayrılarak yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Filtrelili tüpe tekrar 500 µL yıkama tamponu eklendi. İ içe geçmiş tüpler 8000 g’de 1 dakika santrifüjlendi.
7. Szlen sıvı atıldıktan sonra i içe geçmiş tüpler 13000 g’de 10 saniye daha santrifüjlendi. Koleksiyon tüpü atıldı.
8. Filtrelili tüp 1.5 mL’lik steril mikrosantrifüj tüpüne takıldı. Filtrelili tüpe 200 µL elüsyon tampon eklendi. İ içe geçmiş tüpler 8000 g’de 1 dakika santrifüjlendi.
9. DNA’yı içeren mikrosantrifüj tüpü real time PCR işlemi yapılına kadar -20 °C’de saklandı.

Real Time PCR

Delta 32 delesyonunun saptanması için LightCycler™ sistemi ve “LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I” kullanıldı. İşlem amplifikasyon ve erime eğrisi analizi olmak üzere iki aşamada gerçekleştirildi.

Delesyonun saptanması için kullanılan primerler (Tablo 3) ve SYBR Green master (Tablo 4) içeriği tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 3. Delta 32 delesyon primerleri

<i>Primer</i>	<i>Baz Dizilimi</i>
D32-F	5’-ACCTGCAGCTCTCATTTTCC- 3’
D32-R	5’-CCAGCCCCAAGATGACTATC- 3’

Tablo 4. LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I

<i>Kit Bileşeni</i>
LightCycler FastStart Enzim
LightCycler FastStart Reaksiyon Karışımı SYBR Green I
MgCl ₂ stok solüsyonu, 25 Mm
Distile H ₂ O

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I hazırlanması

- 1 viyal LightCycler FastStart enzim ve 1 viyal LightCycler FastStart reaksiyon karışımı hafifçe çalkalandı.
- Enzimin 10 µL'si 1 viyal reaksiyon karışımının içine pipetlendi. Vorteksleme yapmadan pipetle karıştırıldı.
- İşlem 3 viyal reaksiyon karışımı için tekrarlandı ve 96 testlik reaksiyon karışımı elde edildi.
- Viyaller "LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I" olarak etiketlendi.
- Oluşturulan karışımlar işlem anına kadar -20 °C'de saklandı.

Primer karışımının hazırlanması

Boş bir reaksiyon tüpü primer karışımı olarak etiketlendi, aşağıdaki bileşenler sırasıyla pipetlendi ve hafifçe karıştırıldı.

- 10 µL "forward primer"
- 10 µL "reverse primer"
- 80 µL distile H₂O

Reaksiyon karışımının hazırlanması

Real time PCR işleminden hemen önce boş bir reaksiyon tüpü 32 örneklilik karışım olarak etiketlendi, aşağıdaki bileşenler sırasıyla pipetlendi ve hafifçe karıştırıldı.

- 166.4 µL distile H₂O
- 25.6 µL MgCl₂
- 16 µL primer karışımı
- 32 µL LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I

Real Time PCR ve erime eğrisi analizi basamakları

- Her bir hasta için reaksiyon karışımından 7.5 µL, ekstrakte edilen DNA'dan 2.5 µL önceden soğutulmuş LightCycler kapillerlerine eklendi.
- Kapillerler durdurucu ile kapatılarak 700 g'de 5 saniye santrifüjlendi.
- Kapillerler LightCycler cihazının rotoruna yerleştirildi.
- 95 °C'de 10 dakika pre-inkübasyonu takiben 95 °C'de 10 saniye, 60 °C'de 10 saniye ve 72 °C'de 10 saniye olmak üzere 45 döngü amplifikasyon yapıldı.
- Melting curve 65 °C'den 95 °C'ye 0.1 °C/saniye eğimle oluşturulurken floresans 530 nm dalga boyunda ölçüldü.
- LightCycler rotoru soğutuldu.
- 32 baz çifti delesyonu içeren ampikonlar içermeyenlere göre 2 °C daha düşük erime sıcaklığına sahip olması sayesinde tespit edildi.

VERİLERİN ANALİZİ

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 16.0 (Chicago, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. Veriler aritmetik ortalama \pm standart sapma ($x \pm SD$) veya ortanca ve çeyreklikler arası fark (m ; IQR) olarak ifade edildi.

Çalışmadaki değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi.

Normal dağılıma uyan ölçümsel değişkenlerin gruplar arasındaki farkı tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile değerlendirildi. Normal dağılıma uymayan ölçümsel değişkenlerin gruplar arasındaki farkı Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Belirlenen farkın hangi gruplar arasında olduğunu

saptamak için parametrik koşulları sağlayan verilere post-hoc testlerden (çoklu karşılaştırma testleri) Tukey testi, karşılamayan verilere de Bonferroni düzeltilmiş Mann Whitney U testi uygulandı. Ölçümsel olmayan değişkenler için ki-kare testi kullanıldı.

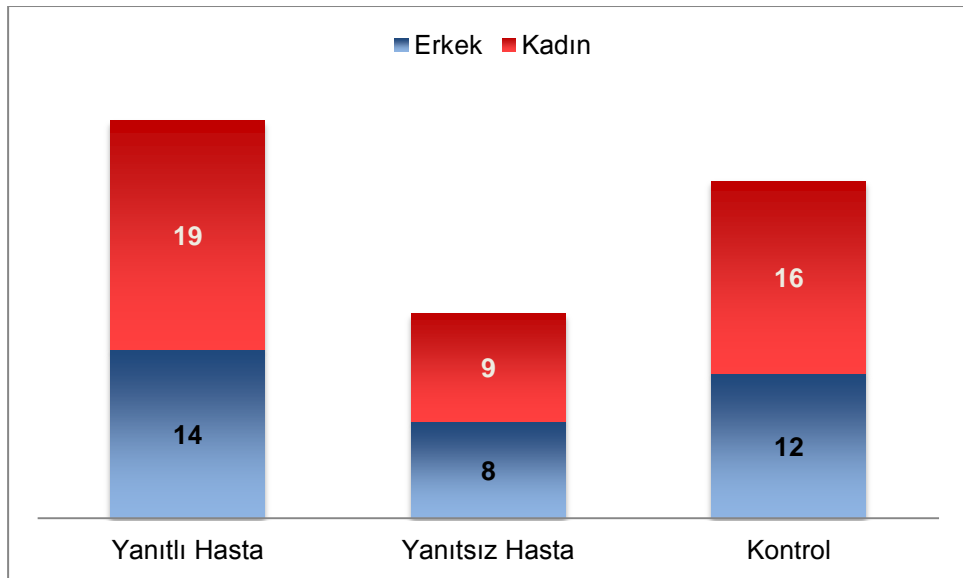
Bonferroni düzeltilmiş Mann-Whitney U testinde anlamlılık sınırı $p < 0.05/3$ (0.016) kabul edildi. Diğer tüm istatistiksel analizler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya 32 kadın, 24 erkek olmak üzere toplam 56 hasta dahil edildi. Tedavi başlanmayan 4 hasta ve yan etkiler nedeniyle tedavisi kesilen 2 hasta çalışmadan çıkarıldı. Hasta verileri 28 kadın, 22 erkek olmak üzere toplam 50 hasta ile analiz edildi. Verileri analiz edilen 50 hastadan 43 tanesinin kanı tedavi tamamlandıktan sonra alındı, 7 hastanın kanı ise tedavi başlangıcında alındı.

Hasta grubu tedavi yanıtına göre “yanıtlı hastalar” ve “yanıtsız hastalar” olmak üzere iki gruba ayrıldı. Yanıt değerlendirilmesi tedavi süresince ve tedavi sonrasında belirlenmiş olan viral yüke göre yapıldı.

Yanıtlı hasta grubu 19 kadın, 14 erkek olmak üzere toplam 33 bireyden oluşmaktaydı. Yanıtsız hasta grubu 9 kadın, 8 erkek olmak üzere toplam 17 bireyden oluşmaktaydı. Kontrol grubu 16 kadın ve 12 erkek olmak üzere toplam 28 bireyden oluşturuldu. Kadın hastalar yanıtsız hastaların %52.9’unu, yanıtlı hastaların ise %57.6’sını oluşturmaktaydı. Kadın hastaların %32.1’i yanıtsız iken, erkek hastaların %57.1’i yanıtsızdı. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımları grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil 21).



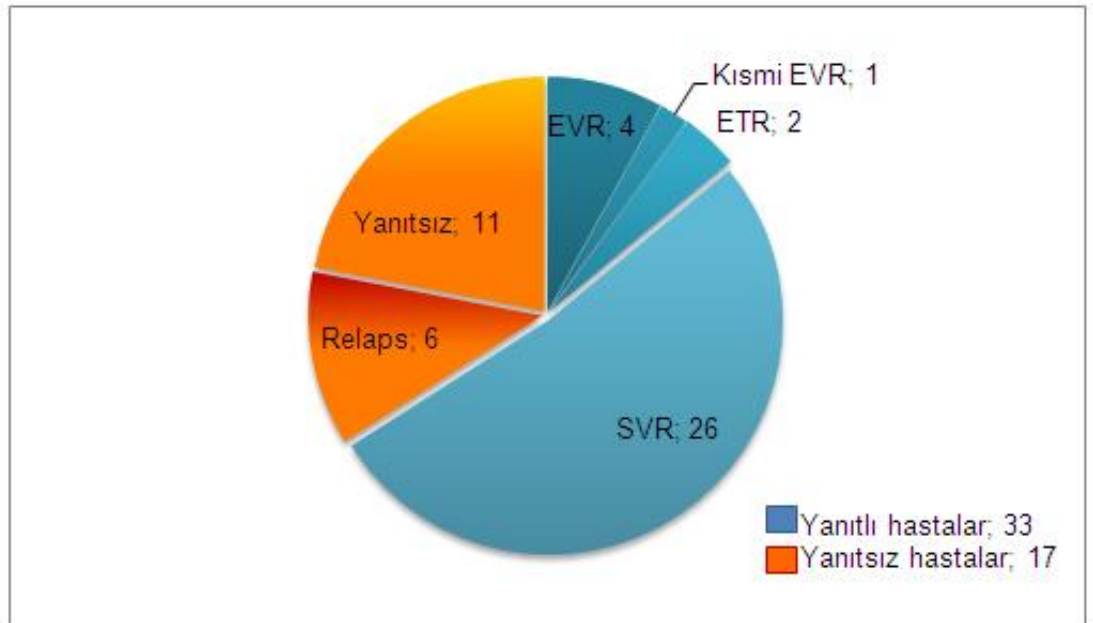
Şekil 21. Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımları

Hasta grupları kanların alınma anındaki vireminin testlere etkisinin ortaya konması için “viremik hasta” ve “viremik olmayan hasta” olmak üzere iki gruba ayrıldı. HCV-RNA testinin pozitif olması viremi kriteri olarak kullanıldı. Viremik hasta grubu ve viremik olmayan hasta grubunun tedaviye yanıt durumları tabloda gösterilmiştir (Tablo 5). Kanların alındığı anda viremik olan ve takiplerinde tedaviye yanıt alınan 8 hastanın (viremik yanıtlı hastalar) 2 tanesinde SVR, 1 tanesinde tedavi sonu yanıtı (ETR), 4 tanesinde erken virolojik yanıt (EVR), 1 tanesinde ise kısmi EVR elde edildi. Yanıtsız olup viremik olmayan 1 hastanın ise HCV-RNA pozitifliği tedavi sonrasında tespit edildi.

Tablo 5. Viremik ve viremik olmayan hasta gruplarının özellikleri

	<i>Viremik Hastalar</i> <i>n=24</i>	<i>Viremik Olmayan Hastalar</i> <i>n=26</i>
Yanıtlı Hastalar <i>n=33</i>	8	25
Yanıtsız Hastalar <i>n=17</i>	16	1

Hasta grubunun virolojik yanıtlarının dağılımları ve olgu sayıları grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil 22).



Şekil 22. Hasta grubunun virolojik yanıt dağılım grafiği

EVR: Erken virolojik yanıt, ETR: tedavi sonu yanıtı, SVR: Kalıcı virolojik yanıt

Kolmogorov-Smirnov testi ile CXCL10 düzeyleri haricindeki tüm ölçümlerin normal dağılıma uyduğu tespit edildi.

Hasta grupları ve kontrol grubu arasında yaş ($p=0.335$) ve cinsiyet ($p=0.948$) açısından anlamlı fark yoktu. Kontrol grubu ile hasta gruplarının yaş ve cinsiyet özellikleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Hasta ve kontrol gruplarının özelliklerinin karşılaştırılması

	<i>Yanıtli Hastalar</i> <i>n=33</i>	<i>Yanıtsız Hastalar</i> <i>n=17</i>	<i>Kontrol</i> <i>n=28</i>
Yaş (x ±SD yıl)	47.7±9.9	50.2±9.58	52±12.3
Erkek Cinsiyet (%)	42.4	47.1	42.9
Kadın Cinsiyet (%)	57.6	52.9	57.1

x ±SD: Ortalama±standart sapma

Yanıtli hasta grubu ve yanıtsız hasta grubunda CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzde oranı kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.022$ ve $p=0.039$). Yanıtli hasta grubu ve yanıtsız hasta grubu arasında ise CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzde oranları açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0.971$). Kontrol grubu ile hasta gruplarının CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzde oranları tabloda gösterilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Hasta ve kontrol gruplarının kemokin reseptör düzeyleri

	<i>Yanıtli Hastalar</i> <i>n=33</i>	<i>Yanıtsız Hastalar</i> <i>n=17</i>	<i>Kontrol</i> <i>n=28</i>
CCR5⁺, CD8⁺ (%)	15.59	16.01	11.36
CXCR3⁺, CD8⁺ (%)	23.20	22.14	16.15

Yanıtli hasta grubu ve yanıtsız hasta grubunda CXCR3⁺-CD8⁺ pozitif lenfositlerin yüzde oranları kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.021$). Yanıtli hasta grubu ve yanıtsız hasta grubu arasında

ise CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzde oranları açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0.872$). Kontrol grubu ile hasta gruplarının CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzde oranları tabloda gösterilmiştir (Bkz. Tablo 7).

Yanıtlı hasta grubu ve yanıtız hasta grubunda CCL3 düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.011$ ve $p=0.001$). Yanıtlı hasta grubu ve yanıtız hasta grubu arasında ise CCL3 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0.358$). Kontrol grubu ile hasta gruplarının CCL3 düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. Hasta ve kontrol gruplarının kemokin ligand düzeyleri

	<i>Yanıtlı Hastalar</i> <i>n=33</i>	<i>Yanıtlız Hastalar</i> <i>n=17</i>	<i>Kontrol</i> <i>n=28</i>
CCL3 (x ±SD pg/mL)	3.64±4.73	5.09±3.45	0.94±1.10
CCL4 (x ±SD pg/mL)	59.87±20.52	63.75±20.50	48.94±20.15
CCL5 (x ±SD ng/mL)	59.53±81.38	40.94±17.29	29.78±12.61
CXCL9 (x ±SD ng/mL)	2.07±2.57	2.55±2.44	0.63±0.30
CXCL10 (m(IQR) pg/mL)	169.75(132.47)	398.04(302.49)	92.24(61.76)

x ±SD: Ortalama±standart sapma, m: Medyan, IQR: Çeyreklikler arası fark

Hem yanıtlı hasta grubu ve yanıtız hasta grubu ile kontrol grubu arasında ($p=0.099$, $p=0.053$), hem de yanıtlı hasta grubu ve yanıtız hasta grubu arasında ($p=0.800$) CCL4 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmadı. Kontrol grubu ile hasta gruplarının CCL4 düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Bkz. Tablo 8).

Hem yanıtlı hasta grubu ve yanıtız hasta grubu ile kontrol grubu arasında ($p=0.090$, $p=0.782$), hem de yanıtlı hasta grubu ve yanıtız hasta grubu arasında ($p=0.489$) CCL5 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmadı. Kontrol grubu ile hasta gruplarının CCL5 düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Bkz. Tablo 8).

CXCL9 düzeyleri yanıtli hasta grubu ve yanıtli hasta grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.020$ ve $p=0.008$). Yanıtli hasta grubu ve yanıtli hasta grubu arasında ise CXCL9 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0.713$). Kontrol grubu ile hasta gruplarının CXCL9 düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Bkz. Tablo 8).

Yanıtli hasta grubu ve yanıtli hasta grubunda CXCL10 düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.001$) Yanıtli hasta grubunun CXCL10 düzeyleri yanıtli hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.001$). Kontrol grubu ile hasta gruplarının CXCL10 düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Bkz. Tablo 8).

Viremik hasta grubu ile viremik olmayan hasta grubu arasında $CCR5^+-CD8^+$ lenfositlerin yüzde oranları açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0.494$). Viremik ve viremik olmayan hasta gruplarının $CCR5^+-CD8^+$ lenfositlerin yüzde oranları tabloda gösterilmiştir (Tablo 9).

$CXCR3^+-CD8^+$ lenfositlerin yüzde oranları açısından viremik hasta grubu ile viremik olmayan hasta grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.990$). Viremik ve viremik olmayan hasta gruplarının $CXCR3^+-CD8^+$ lenfositlerin yüzde oranları tabloda gösterilmiştir (Bkz. Tablo 9).

Tablo 9. Viremi durumuna göre kemokin reseptör düzeyleri

	<i>Viremik Hastalar</i> <i>n=24</i>	<i>Viremik Olmayan Hastalar</i> <i>n=26</i>	<i>p</i>
CCR5⁺, CD8⁺ (%)	16.60	14.93	0.494
CXCR3⁺, CD8⁺ (%)	22.82	22.86	0.990

Viremik hasta grubu ile viremik olmayan hasta grubu arasında CCL3 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0.417$). Viremik ve viremik olmayan hasta gruplarının CCL3 düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 10).

CCL4 düzeyleri açısından viremik hasta grubu ile viremik olmayan hasta grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.442$). Viremik ve viremik olmayan hasta gruplarının CCL4 düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Bkz. Tablo 10).

Tablo 10. Viremi durumuna göre kemokin ligand düzeyleri

	<i>Viremik Hastalar</i> <i>n=24</i>	<i>Viremik Olmayan Hastalar</i> <i>n=26</i>	<i>p</i>
CCL3 ($\bar{x} \pm SD$ pg/mL)	5.18 \pm 4.30	3.17 \pm 4.25	0.417
CCL4 ($\bar{x} \pm SD$ pg/mL)	60.18 \pm 22.88	62.12 \pm 18.20	0.442
CCL5 ($\bar{x} \pm SD$ ng/mL)	40.22 \pm 20.32	65.19 \pm 90.18	0.211
CXCL9 ($\bar{x} \pm SD$ ng/mL)	2.95 \pm 3.03	1.58 \pm 1.72	0.008
CXCL10 (<i>m</i> (IQR) pg/mL)	405.30(278.37)	155.08(74.56)	<0.001

$\bar{x} \pm SD$: Ortalama \pm standart sapma, *m*: Medyan, IQR: Çeyreklikler arası fark

Viremik hasta grubu ile viremik olmayan hasta grubu arasında CCL5 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0.211$). Viremik ve viremik olmayan hasta gruplarının CCL5 düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Bkz. Tablo 10).

Viremik hasta grubunun CXCL9 düzeyleri viremik olmayan hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ($p=0.008$). Viremik ve viremik olmayan hasta gruplarının CXCL9 düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Bkz. Tablo 10).

Viremik hasta grubunun CXCL10 düzeyleri viremik olmayan hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ($p<0.001$). Viremik ve viremik olmayan hasta gruplarının CXCL10 düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Bkz. Tablo 10).

Hastalar HCV-RNA düzeyinin 2×10^6 IU/mL'nin üzerinde veya altında olmasına göre gruplandırıldığında gruplar arasında CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin ve CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzde oranları açısından anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.265$, $p=0.180$) (Tablo 11).

Tablo 11. HCV-RNA düzeyine göre kemokin reseptör düzeyleri

	<i>HCV-RNA</i> < 2x10 ⁶ <i>IU/mL</i> <i>n</i> =42	<i>HCV-RNA</i> ≥ 2x10 ⁶ <i>IU/mL</i> <i>n</i> =8	<i>p</i>
CCR5⁺, CD8⁺ (%)	15.20	18.56	0.265
CXCR3⁺, CD8⁺ (%)	22.14	26.54	0.180

Hastalar HCV-RNA düzeyinin 2x10⁶ IU/mL'nin üzerinde veya altında olmasına göre gruplandırıldığında gruplar arasında CCL3, CCL4, CCL5 ve CXCL9 düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.677$, $p=0.723$, $p=0.288$ ve $p=0.423$). CXCL10 düzeyleri ise HCV-RNA düzeyi 2x10⁶ IU/mL'nin üzerinde olan grupta anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.022$) (Tablo 12).

Tablo 12. HCV-RNA düzeyine göre kemokin ligand düzeyleri

	<i>HCV-RNA</i> < 2x10 ⁶ <i>IU/mL</i> <i>n</i> =42	<i>HCV-RNA</i> ≥ 2x10 ⁶ <i>IU/mL</i> <i>n</i> =8	<i>p</i>
CCL3 (x ±SD pg/mL)	4.03±4.30	4.68±4.25	0.677
CCL4 (x ±SD pg/mL)	61.60±22.88	59.03±18.20	0.723
CCL5 (x ±SD ng/mL)	55.45±20.32	41.42±90.18	0.288
CXCL9 (x ±SD ng/mL)	2.33±3.03	1.74±1.72	0.423
CXCL10 (<i>m</i> (IQR) pg/mL)	177.65(225.27)	484.91(268.55)	0.022

x ±SD: Ortalama±standart sapma, *m*: Medyan, IQR: Çeyreklikler arası fark

CCR5 delta 32 delesyonu açısından hasta ve kontrol gruplarının tamamı “doğal tip” olarak tespit edildi. Homozigot ya da heterozigot delesyona rastlanmadı.

Hasta gruplarından HCV genotipi ile ilgili verilerine ulaşılan 31 hastadan 29 hastanın HCV genotipi tip 1b, 1 hastanın HCV genotipi tip 2b, 1 hastanın HCV genotipi tip 3a olarak tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

HCV; tüm dünyada 130-170 milyon insanda var olan önemli bir kronik karaciğer hastalığı etkenidir. HCV ile enfekte olan bireylerin %50-85'inde HCV RNA pozitifliği ile ortaya konan kronik HCV enfeksiyonu gelişmektedir. Kronik HCV enfeksiyonu olan hastaların %25'inde siroz gelişirken, siroz gelişen hastaların büyük çoğunluğu da hepatoselüler karsinoma ilerlemektedir (2).

HCV enfeksiyonunun akut döneminde spontan eradikasyonun sağlanması için çeşitli viral epitoplara karşı güçlü bir CD4 ve CD8 yanıtı gerekmektedir. Virüse özgü immün yanıtı geliştiremeyen veya yanıtı zamanla azalan olgular kronikleşmektedirler (40).

Akut HCV enfeksiyonu ile ilgili çalışmaları insanlarda yapmanın çeşitli zorluklara sahip olması ve HCV enfeksiyonu sürecini tam olarak ortaya koyabilen güvenilir hayvan modellerinin kısıtlı olması nedeni ile HCV enfeksiyonunda oluşan inflamasyon ve rol alan kemokinler ile ilgili veriler kronik enfeksiyon fazına dayandırılmaktadırlar (40).

Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğer lezyonlarının oluşmasına ve ilerlemesine neden olan mekanizma ya da mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır. Bununla birlikte HCV viral yükü ile karaciğer hastalığının ciddiyeti ve prognozu arasında ilişki bulunmaması HCV'nin sitopatik olmadığını düşündürmektedir (24).

Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğer hasarının bileşenleri portal lenfoid infiltrasyon, fokal ve köprüleşme nekrozları ile dejeneratif lobüler lezyonlardır. Bu lezyonlar adezyon molekülleri ve kemokinler aracılığı ile karaciğerde toplanan T hücreleri tarafından oluşturulan bölgesel immün yanıtı bağli olarak meydana gelmektedirler. Oluşan lenfoid infiltrat esas olarak periportal aralıkta bulunan CD4⁺ tip 1 yardımcı T hücreler ile hem periportal hem de lobüler alanlarda yer alan CD8⁺ T hücreleri içermektedir. Karaciğerde oluşan lezyonların ciddiyeti tip 1 yardımcı T hücreler ile ilişkili sitokinlerin bölgesel ekspresyonu ile ilişkilidir (24).

Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğere lenfosit göçünde kemokinler oldukça önemlidirler. Enfeksiyon süresince oluşan karaciğer hasarına kemokinler öncülük etmektedirler (40).

Uzamış HCV enfeksiyonunda karaciğerde esas olarak CD8⁺ T hücrelerden oluşan ve özgün olmayan inflamatuvar infiltrat bulunmaktadır. Bu hücreler, karaciğerde salgılanan kemokinler ve T hücreleri üzerindeki kemokin reseptörleri arasındaki etkileşim sonucunda karaciğere gelmektedirler (4).

Hepatositlerde HCV replikasyonunun devam etmesi kemokin üretimine yol açarak inflamatuvar hücrelerin sürekli olarak karaciğerde toplanmasını sağlamaktadır. Toplanan bu inflamatuvar hücreler de kemokin ve sitokin üretimine yol açarak sürekli bir inflamatuvar döngü oluşturmaktadırlar (40).

Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğere baskın olarak T_h1 ve T_c1 fenotipindeki lenfositler göç etmektedirler. Bu tipteki lenfositler yüzeylerinde CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptörlerini yüksek miktarlarda eksprese etmektedirler. Karaciğerde salgılanan ELR “-” CXC kemokinler CXCR3 eksprese eden lenfositleri karaciğere yönlendirmekte, CC kemokinler ise CCR5 eksprese eden lenfositleri karaciğere yönlendirmektedirler. Kronik HCV enfeksiyonunda hepatik lobülde ve portal bölgelerde CCR5 ve CXCR3 eksprese eden T lenfositler yoğun olarak bulunmaktadır. Sağlıklı bireylerin karaciğerlerinde ise bu kemokin reseptörlerini eksprese eden hücreler çok düşük miktarlarda bulunmaktadır (4).

Standart pegile interferon ve ribavirin tedavisi ile kronik HCV enfeksiyonlu hastaların ancak %55’inde SVR elde edilmektedir. Tedavi başarısızlığına virüse ait faktörler ve konak faktörleri birlikte etki etmektedirler (36).

İnflamasyondaki rolünün yanı sıra bazı kemokinlerin ve reseptörlerinin antiviral tedavi yanıtının iyi bir göstergesi de olan bir konak faktörü olabileceğine vurgu yapan çalışmalar bulunmaktadır (40).

Sunulan araştırma da HCV ile enfekte hastalarda kemokin reseptörlerinin ve bu reseptörlerle ilişkili kemokinlerin düzeylerinin ve CCR5 delta-32 delesyonunun HCV enfeksiyonunun patogenezi ve özellikle tedavi yanıtındaki payını incelemek amacıyla planlanmıştır.

Kemokin reseptörlerinin HCV enfeksiyonlarının patogenezi ve tedavi yanıtındaki rolü bir süredir araştırmacıların ilgisini çekmektedir.

Larrubia ve arkadaşları, 30 kronik HCV enfeksiyonu bulunan hasta ve 20 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada; hasta grubunda karaciğerin portal ve lobüler bölgelerinde CD8⁺ T hücrelerin arttığını ve bu hücrelerin yüzeylerinde periferik kandaki hücrelere göre daha fazla CCR5 (sırasıyla %76.79; IQR 18.19 ve %31.46; IQR 31.87, $p<0.01$) ve CXCR3 (sırasıyla %73.30; IQR 15.05 ve %61.03; IQR 36.73, $p<0.05$) eksprese ettiklerini göstermişlerdir. CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonu açısından hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır. İntrahepatik CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonu yüksek olan CD8⁺ T hücrelerinin düzeyleri ile porto-periportal ve lobüler inflamasyon arasında pozitif korelasyon bulunurken fibrozis ile korelasyon tespit etmemişlerdir (52).

Perney ve arkadaşları, 50 kronik HCV enfeksiyonu bulunan hasta ve 44 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada; hasta grubunun kanında sağlıklı kontrol grubuna göre CD4⁺ T hücrelerin yüzeyinde CCR5 (sırasıyla %29±12 ve %22±8, $p=0.001$) ve CXCR3 (sırasıyla %49±13 ve %36±11, $p=0.006$) ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Tedavi öncesindeki altı aylık dönem boyunca da hasta grubunun kanındaki CD4⁺ T hücrelerin yüzeyinde CCR5 ve CXCR3 ekspresyonu stabil seyretmiştir (53).

Curbishley ve arkadaşları, karaciğer transplantasyonu yapılan hastaların rezeksiyon yapılan karaciğer dokuları ile yürüttükleri çalışmada; karaciğeri infiltre eden lenfositlerin yüzeyinde CXCR3 ekspresyonunun periferik kandaki lenfositlerden anlamlı olarak fazla olduğunu göstermişlerdir (sırasıyla %7.74±3.27 ve %2.45±2, $p=0.021$) . Hastalıklı olmayan karaciğeri infiltre eden lenfositlerin yüzeyinde (%38.6±8.76, $p<0.001$) de periferik kandaki lenfositlere göre CXCR3

ekspresyonu fazla bulunmuştur ancak en fazla artış inflamasyon karaciğeri infiltrasyon eden lenfositlerdedir (%87.24±9.21, $p<0.001$). Aynı çalışmada CXCR3'ün sadece adezyonda değil aynı zamanda karaciğerde endotelden transmigrationda da rolü olduğu gösterilmiştir (54).

Shields ve arkadaşları, HCV enfeksiyonuna bağlı siroz nedeni ile karaciğer transplantasyonu yapılan hastalardan ve sağlıklı karaciğer donörlerinden elde ettikleri karaciğeri infiltrasyon eden lenfositlerle yaptıkları çalışmada; lenfositlerin yüzeyinde CXCR3 ekspresyonunu ve CCR5 ekspresyonunu sirozlu hastalarda sağlıklı kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Aynı çalışmada karaciğeri infiltrasyon eden lenfositler ile periferik kandaki lenfositler kemokin reseptörleri açısından kıyaslandığında CXCR3 düzeyleri sirozlu hastalarda sırasıyla %12.03±4.9 ve %2.82±0.47 ($p=0.0039$) ve sağlıklı kontrolde sırasıyla %8.83±1.81 ve %2.79±0.44 ($p=0.03$) olarak bulunmuştur. Karaciğeri infiltrasyon eden lenfositler ve periferik kandaki lenfositler için CCR5 düzeyleri ise sirozlu hastalarda sırasıyla %76.2±3.1 ve %29.75±2.9 ($p=0.004$) ve sağlıklı kontrolde sırasıyla %58.6±9.3 ve %27.4±3.5 ($p=0.009$) olarak bulunmuştur (55).

Sunulan araştırmada, hem yanıtı hasta grubunda hem de yanıtı hasta grubunda CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin ve CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzde oranları kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu. HCV enfeksiyonunun akut evresinde yoğun bir şekilde HCV'ye spesifik sitotoksik T lenfosit yanıtı görülürken vireminin kontrol altına alınması ile birlikte bu yanıt azalmaktadır ancak viral kontrolün sağlanamaması durumunda kayda değer sitotoksik T lenfosit yanıtının devam ettiği bildirilmektedir (56). Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğere T_H1 ve T_C1 fenotipindeki lenfositler baskın olarak göç etmektedirler ve bu tipteki lenfositler yüzeylerinde CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptörlerini yoğun olarak ekspresyon etmektedirler (4). Bu sebeplere bağlı olarak sunulan araştırmadaki hasta grubunda da periferik kanda CD8⁺ lenfositlerin CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptör ekspresyonlarının yoğun olmasını beklemekteydik. Perney ve arkadaşları (53) da periferik kanda CD4⁺ T hücrelerde CCR5 ve CXCR3 ekspresyonunu hasta grubunda sağlıklı kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Larrubia ve arkadaşlarının (52) yaptığı çalışma ise bizim çalışmamızın sonuçları ile çelişmektedir. Larrubia ve

arkadaşlarının çalışmasında hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında periferik kandaki CD8⁺ T hücrelerinde CCR5 ve CXCR3 reseptör ekspresyonu açısından anlamlı fark bulunmamıştır, esas ekspresyon artışı karaciğeri infiltre eden lenfositlerde görülmüştür. Oluşan bu farklılık teknik nedenlere bağlı olabilir; kemokin reseptörlerinin ekspresyonu in-vitro olarak hızla düşmektedir, bu nedenle kanın alınmasından akım sitometri işlemine kadar geçen süre reseptör ekspresyonunun belirlenmesinde önemlidir.

Yine sunulan çalışmada yanıtlı hasta grubu ve yanıtız hasta grubu arasında CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin ve CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzde oranları açısından anlamlı fark bulunmadı. Literatürde sunulan çalışmada olduğu şekilde HCV enfeksiyonlarında tedavi yanıt gruplarına göre CCR5 ve CXCR3 ekspresyonlarını araştırılan çalışmalar kısıtlıdır.

Hem viremi varlığına göre hastalar gruplandırıldığında hem de HCV-RNA düzeyine göre hastalar gruplandırıldığında CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzde oranları açısından ve CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzde oranları açısından anlamlı fark bulunmadı. Sunulan çalışmada periferik kan CD8⁺ T lenfositlerin CCR5 ve CXCR3 ekspresyon düzeyi HCV viremisinden etkilenmemiştir. Sunulan çalışma ile elde edilen bulgulara göre hasta gruplarında CD8⁺ lenfositlerin CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonlarının sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olması CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptörlerinin HCV patogenezinde rolü olduğunu düşündürmektedir ancak tedavi yanıtını tahmin etme konusunda fayda sağlamamaktadırlar. CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptörlerinin patogenezdaki rolünün anlaşılabilmesi için periferik lenfositler ile eş zamanlı olarak karaciğeri infiltre eden lenfositlerdeki ekspresyonlarının da immünohistokimyasal tekniklerle gösterilmesine ve ekspresyonun olduğu lenfositlerin yoğunlaştığı karaciğer bölgelerinin de belirlenmesine gereksinim vardır.

Kemokin reseptörlerinin yanı sıra kemokin ligandlarının da HCV enfeksiyonlarının patogenezindeki ve tedavi yanıtındaki rolü araştırılmaktadır.

Damar içi ilaç bağımlıları ile yaptıkları bir çalışmada Zeremski ve arkadaşları; 9 olgunun 10 akut HCV enfeksiyonu epizodunda CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 düzeylerini dinamik olarak takip etmişlerdir. CXCR3 ilişkili kemokinler olan CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 düzeylerinin HCV-RNA'nın tespitini takiben 3-11. haftalarda belirgin olarak yükseldiği görülürken, CCR5 ilişkili kemokinler olan CCL3 ve CCL4 düzeylerinde belirgin bir dalgalanma görülmemiştir. Bu durum çalışmacılar tarafından CCR5 ile ilişkili kemokinlerin akut HCV enfeksiyonunda önemli rolünün bulunmadığı lehinde yorumlanmıştır (57).

İngiltere'de yürüttükleri çalışmada Shields ve arkadaşları, HCV enfeksiyonuna bağlı siroz nedeni ile karaciğer transplantasyonu yapılan hastalar ve sağlıklı karaciğer donörleri ile yaptıkları çalışmada; hepatik CCL3, CCL4, CXCL9 ve CXCL10 ekspresyonlarını incelemiştir. HCV ile enfekte karaciğerde CXCL9 ($p=0.002$) ve CXCL10 ($p=0.015$) ekspresyonlarının sağlıklı olguların karaciğerine göre anlamlı olarak arttığını ve ekspresyonun belirgin olarak sinüzoidal endotelde olduğunu bildirmektedirler (55).

Florholmen ve arkadaşları, 72 kronik HCV enfeksiyonu olan hasta (39 SVR, 33 yanıtız hasta) ve 5 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada; 72 hastanın sadece başvuru anında, 42 hastanın ise hem başvuru anında hem de tedavinin 24. saatindeki serum CCL2, CCL3, CCL4 ve CCL5 kemokin düzeylerini ölçmüşlerdir. Ölçülen tüm kemokin düzeyleri hasta gruplarında sağlıklı kontrole göre yüksek bulunmuştur ancak bu yükseklik sadece CCL2 ve CCL3 için anlamlıdır (sırasıyla $p<0.0005$ ve $p=0.003$). Yanıt grupları arasında ise kemokin düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır. SVR grubunda tedavinin 24. saatindeki CCL3 ve CCL4 düzeyleri başvuru anına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Başvuru anı ile tedavinin 24. saatindeki kemokin düzeyi ortalamalarının farkı SVR grubunda yanıtız gruba göre CCL3, CCL4 ve CCL5 için anlamlı olarak yüksek iken CCL2 için anlamlı fark bulunmamıştır (58).

Kemokinler ile HCV tedavi yanıtı arasındaki ilişkinin incelendiği bir başka çalışmada Apolinario ve arkadaşları, 63 kronik HCV enfeksiyonlu hastanın (36 SVR, 27 yanıtız hasta) tedavi öncesinde, tedavinin 12, 24 ve 48. haftalarında ve

tedavi sonrası 24. haftada CCL4, CXCL9 ve CXCL10 düzeylerini ölçmüşlerdir. Hasta grubunda bazal CCL4, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bazal CXCL10 düzeyi yanıtız hasta grubunda yanıtılı hastalardan anlamlı olarak yüksektir ($p=0.019$). SVR grubunda CCL4 ve CXCL10 düzeyleri anlamlı olarak düşüş gösterirken (sırasıyla $p=0.04$ ve $p=0.02$) CXCL9 düzeylerinde anlamlı düşüş gözlenmemiştir. Yanıtız hastalarda da tedavi ile kemokin düzeylerinde düşüş görülmesine karşın bu düşüş anlamlı bulunmamıştır (59).

Kronik HCV enfeksiyonu tedavisi almak üzere başvuran 95 hastanın dahil edildiği bir araştırmada Lee ve arkadaşları, tedavi yanıtını tahmin etmek için immünolojik belirteçler olan serumda çözünebilen CD30, IL-18, serum IL-13 reseptör $\alpha 2$, TGF- $\beta 1$ ve CXCL10 düzeylerini değerlendirmişlerdir. SVR görülen hastalarda ve SVR görülmeyen hastalarda tedavi öncesi immünolojik belirteçler açısından fark saptanmazken, SVR görülen hastalarda SVR görülmeyen hastalara göre TGF- $\beta 1$ düzeyleri hafif yüksek, CXCL10 düzeyleri ise hafif düşük olarak saptanmıştır. Elde edilen TGF- $\beta 1$ ve CXCL10 düzeylerini göre oluşturulan ve “TIP” olarak adlandırılan skorlama sistemi Hepaskor ile kıyaslanmıştır. TIP skoru ile tedavi yanıtı %81 duyarlılık ve %58 özgülük ile tahmin edilmiştir. Ayrıca TIP skoru tedavi yanıtını tespit etmede HCV genotipine üstün bulunmuştur ($p=0.003$) (60).

Zeremski ve arkadaşları, CXCR3 ilişkili kemokinler ile inflamasyon arasındaki potansiyel ilişkiyi ortaya koymak amacıyla yaptıkları çalışmada 106 kronik HCV enfeksiyonu olan hasta ve 6 enfekte olmayan kontrolün karaciğer biyopsi materyallerinde CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 mRNA ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Enfekte grupta değerlendirilen her üç kemokinin intrahepatik mRNA ekspresyonları enfekte olmayan gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.00001$). Ciddi lobular ve portal inflamasyonu olan ve fibrozis evresi yüksek olan hastalarda da intrahepatik mRNA düzeyleri anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir. Demografik ve virolojik parametrelerin etkisi çıkarıldığında sadece CXCL10 ile intrahepatik lobular inflamasyon arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur. HCV genotip 1 ile enfekte hastalarda da HCV genotip 2 ile enfekte olan hastalara göre CXCL10 mRNA düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (61).

Lagging ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada HCV genotip 1 ile enfekte 173 hastanın tedavi öncesi plazma CXCL10 düzeylerinin tedavi yanıtı ile ilişkisini değerlendirmişlerdir. Hızlı virolojik yanıt (RVR) ve SVR elde edilen hastalarda tedavi öncesi CXCL10 düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur (sırasıyla $p<0.0001$ ve $p=0.0002$) . Çok değişkenli lojistik regresyon analizlerinde düşük CXCL10 değeri RVR ve SVR için bağımsız olarak prediktif bulunmuştur. HCV genotip 1 ile enfekte hastalarda bazal CXCL10 düzeyi için 600pg/mL değeri cut-off olarak alındığında negatif prediktif değeri %79 bulunmuştur (62).

HCV ile enfekte 265 hastada plazma CXCL10 düzeylerinin karaciğer histolojisi, viral yanıt ve tedavi seyri ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada hastaların plazma CXCL10 düzeyleri tedavi öncesinde, tedavi sırasında ve tedavi sonrasında ölçülmüştür. HCV genotip 1 veya HCV genotip 4 ile enfekte hastalarda bazal plazma CXCL10 düzeyinin 150pg/mL değerinin altında olması, bazal plazma CXCL10 düzeyinin ≥ 150 pg/mL olmasına göre RVR elde edilmesi ile anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur. HCV genotip 1 veya 4 ile enfekte hastalardan SVR elde edilenlerde SVR elde edilemeyenlere göre bazal CXCL10 düzeyleri anlamlı olarak düşüktür ($p<0.0001$) ancak HCV genotip 2 veya 3 ile enfekte edilenlerde bu şekilde bir ilişki gözlenmemiştir. SVR elde edilen hastalarda HCV genotipinden bağımsız olarak tedavinin 12. haftasında CXCL10 düzeylerinde bazal CXCL10 düzeylerine göre kaydedilen düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0002$). Tüm HCV genotipleri ($p=0.05$) ancak özellikle HCV genotip 1 ($p<0.0001$) için tedavi öncesi viral yükün 2×10^6 IU/mL değerinin üzerinde olduğu hastalarda CXCL10 düzeyi, viral yükü 2×10^6 IU/mL değerinin altında olanlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (63).

Fattovich ve arkadaşları, HCV enfeksiyonu bulunan ve henüz tedavi almamış 280 hastada bazal CXCL10 düzeyi, tedavi öncesi HCV viral yükü ve IL28B polimorfizminin virolojik yanıtta etkisini değerlendirmişlerdir. HCV genotip 1 ile enfekte hastaların çok değişkenli analizlerinde; düşük bazal CXCL10 düzeyi, IL28B *rs12980275* polimorfizmi, 400000 IU/mL'nin altında tedavi öncesi HCV viral yükü,

hasta yaşının 40 yaş altında olması, düşük gama glutamil transpeptidaz düzeyi ve RVR elde edilmiş olması SVR ile ilişkili bulunmuştur (64).

Sunulan araştırmada, hem yanıtlı hasta grubunda hem de yanıtız hasta grubunda serum CCL3, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunurken, serum CCL4 ve CCL5 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. CCR5 ile ilişkili kemokin ligandları açısından bakıldığında çalışmamızın sonuçları Florholmen ve arkadaşlarının (58) alışmasıyla CCL3, CCL4 ve CCL5 için uyumlu iken Zeremski ve arkadaşlarının (57) alışmasıyla CCL3 açısından çelişmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre CCL3 düzeylerinin ve beraberinde reseptörü CCR5'in ekspresyonunun hasta gruplarında anlamlı olarak yüksek olduğu göz önünde bulundurulduğunda, CCL3'n HCV enfeksiyonlarının patogenezinde rolü olduğu düşünülebilir. CXCR3 ile ilişkili kemokin ligandları açısından bakıldığında Apolinario ve arkadaşlarının (59) alışmasında olduğu gibi sunulan çalışmada da CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri hasta gruplarında kontrole göre yüksektir ancak ölçülen düzeylerin çoğunluğu (50 hastanın 43 tanesi) tedavi sonrası düzeydir, Apolinario ve arkadaşlarının yüksektir olarak buldukları ölçümler ise bazal düzeylerdir ve tedavi sonrasında yanıtlı grupta yanıtız gruba göre anlamlı olarak düşmüştür. Sunulan araştırmaya benzer şekilde Zeremski ve arkadaşları (61) da CXCR3 ile ilişkili kemokinlerin hepatik ekspresyonlarını HCV enfeksiyonu bulunan hastalarda sağlıklı kontrole göre anlamlı olarak yüksektir bulmuşlardır. Sunulan araştırma CXCR3 ile ilişkili ligandlar olan CXCL9 ve CXCL10 kemokinlerinin HCV enfeksiyonunda rolü olduğunu göstermektedir.

Sunulan çalışmada serum CCL3, CXCL9 ve CXCL 10 düzeyleri hasta grupları arasında karşılaştırıldığında CCL3 ve CXCL9 için yanıtlı ve yanıtız hastalar arasında fark bulunmazken, serum CXCL10 düzeyleri yanıtız hasta grubunda yanıtlı hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksektir bulundu. CCL3 için bu araştırmada elde edilen sonuçlar Florholmen ve arkadaşlarının (58) yaptığı çalışma ile uyumludur. CXCL10 için bu araştırmanın sonuçları Apolinario ve arkadaşlarının (59) alışması ile benzerdir; Apolinario ve arkadaşları yanıtız hastalarda bazal CXCL10 düzeyini yanıtlı hastalara göre yüksektir bulmuşlardır ve tedavi sonrasında yanıtlı hastalarda düzeyler anlamlı olarak düşmüştür, sunulan çalışmada ise ağırlıklı olarak tedavi

sonrası düzeyler ölçülerek yanıtız hastalarda yanıtlı hastalara göre CXCL10 düzeyini yüksek bulunmuştur. Sunulan çalışmada bulduğumuz CXCL10 düzeyleri ve tedavi yanıtı arasındaki ilişki benzer şekilde Lagging ve arkadaşları (62), Romero ve arkadaşları (63) ve Fattovich ve arkadaşlarının (64) yaptıkları çalışmalarda da vardır.

Viremi durumuna göre hastaların serum kemokin düzeyleri karşılaştırıldığında CCL3, CCL4 ve CCL5 için anlamlı fark bulunmazken, serum CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri viremik hastalarda viremik olmayan hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. HCV-RNA düzeyine göre (2×10^6 IU/mL değerinin üzerinde veya altında olmasına göre) hastaların serum kemokin düzeyleri karşılaştırıldığında CCL3, CCL4, CCL5 ve CXCL9 için anlamlı fark bulunmazken, serum CXCL10 düzeyleri viral yükü 2×10^6 IU/mL değerinin üzerinde olan hastalarda viral yükü 2×10^6 IU/mL değerinin altında olanlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamıza benzer şekilde HCV viral yüküne göre plazma CXCL10 düzeylerini kıyaslayan Romero ve arkadaşları (63) tedavi öncesi viral yükün 2×10^6 IU/mL değerinin üzerinde olduğu hastalarda CXCL10 düzeyini, viral yükü 2×10^6 IU/mL değerinin altında olanlara göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır.

CCR5 kemokin reseptörünün HCV enfeksiyonlarının patogeneğinde ve tedavi yanıtında payının olduğunun çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olması araştırmacıları CCR5 delta 32 delesyonunun HCV enfeksiyonları ile ilişkisini incelemeye yöneltmiştir.

Wald ve arkadaşları, 127 kronik HCV enfeksiyonu bulunan hasta, 48 HCV enfeksiyonu ile ilişkili son dönem karaciğer yetmezliği nedeni ile karaciğer transplantasyonu yapılan hasta ve 75 HCV dışı nedenlerle karaciğer transplantasyonu yapılan hasta olmak üzere toplam 250 yahudi İsrail asıllı hastada CCR5 delta 32 delesyonunun varlığını araştırmışlardır. HCV için seropozitif olan 175 hastadan sadece birinde homozigot mutasyon saptanmıştır. HCV seropozitif hastalarda CCR5 delta 32 alleli sıklığı %16.5 olarak bulunmuştur. Alt gruplar arasında da mutasyon sıklığı benzer bulunmuştur. Karaciğer histopatolojisine ait verisi bulunan heterozigot mutant 21 hasta ve mutasyon bulunmayan 47 hasta karşılaştırıldığında, heterozigot

mutantlarda hepatik inflamasyonun anlamlı olarak az olduğu ($p<0.005$) tespit edilmiştir (65).

İspanya'da 139 kronik HCV enfeksiyonlu hasta ve 100 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada Ferrer ve arkadaşları, CCR5 delta 32 delesyonunun ve CCR2 V641 polimorfizminin varlığını araştırmışlardır. Tedavi öncesinde 85 hastaya karaciğer biyopsisi yapılarak Knodell histolojik aktivite indeksleri elde edilmiştir. Hasta grubunda CCR5 delta 32 allel sıklığı %5.4 bulunurken kontrol grubunda %7.5 olarak bulunmuştur ($p=0.46$). Ayrıca CCR5 delta 32 delesyonunun varlığının karaciğerdeki histopatolojik bulgulara etki etmediği gösterilmiştir (66).

Woitars ve arkadaşları, 153 HCV enfeksiyonlu hasta, 102 HIV enfeksiyonlu hasta, 130 HCV/HIV ko-enfeksiyonlu hasta ve 102 sağlıklı kan donörü ile yaptıkları çalışmada CCR5 delta 32 delesyon varlığını araştırmışlardır. CCR5 delta 32 allel sıklığı tek başına HCV enfeksiyonu bulunan hastalarda (%16, $p<0.05$) ve HCV/HIV ko-enfeksiyonlu hastalarda (%12.7) sağlıklı kan donörlerine (%8.3) ve tek başına HIV enfeksiyonu bulunan hastalara (%9.3) göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca CCR5 delta 32 alleli için homozigot olan hastalarda HCV viral yükü doğal tip allele sahip hastalardan yüksek ($p=0.045$) bulunmuştur (67).

Wasmuth ve arkadaşları, Almanya'nın iki farklı bölgesinden (Aachen ve Berlin) toplam 333 hemofilisi bulunmayan HCV enfeksiyonlu hasta ve 125 HCV enfeksiyonu için yüksek riske sahip ancak anti-HCV negatif kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada CCR5 delta 32 delesyonunun varlığını araştırmışlardır. CCR5 delta 32 allel sıklığı açısından her iki hasta grubu ve kontrol grubu (sırasıyla %7.6, %9.5 ve %10.4) arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Her iki hasta grubunda da CCR5 delta 32 allelini taşıyanlar ile taşımayanlar arasında HCV viral yükü ve HCV genotipi açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Berlin kohortunda SVR görülme sıklığı CCR5 delta 32 allelini taşımayanlarda bu alleli heterozigot taşıyanlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.03$). Ancak Aachen kohortunda ve iki kohort birlikte hesaplandığında SVR sıklığı açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Aachen kohortunda CCR5 delta 32 alleleline sahip hastalarda ortalama portal/periportal ve lobüler nekro-inflamatuvar aktivite bu allele sahip olmayanlara

göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.02$). Ancak Berlin kohortunda ve iki kohort birlikte hesaplandığında nekro-inflamatuvar aktivite açısından anlamlı fark bulunmamıştır (68).

Ahlenstiel ve arkadaşları, interferon- α monoterapisi alan 78 hasta ve interferon-ribavirin kombinasyon tedavisi alan 78 hasta ile yaptıkları çalışmada CCR5 delta 32 alleli varlığı ile tedavi yanıtı arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Kombine tedavi alanlarda monoterapiye göre ETR ve SVR elde edilme oranları anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Kombine tedavi alanlar ile monoterapi alanlar arasında CCR5 delta 32 allelini bulundurma sıklığı açısından fark görülmemiştir (sırasıyla %20.5 ve %24.4, $p=0.7$). CCR5 delta 32 allelini taşıyan hastalarda ETR elde edilme sıklığı bu alleli taşımayanlara göre anlamlı olarak düşük bulunurken, SVR elde edilme sıklığı için anlamlı fark gözlenmemiştir. Monoterapi grubunda CCR5 delta 32 allelinin varlığı ETR elde edilmesi için bağımsız negatif prediktör olarak bulunmuştur ($p=0.03$). Kombinasyon tedavisi alan grupta ise CCR5 delta 32 allelinin varlığı tedavi yanıtını etkilememiştir (47).

HCV enfeksiyonu bulunan 163 Belçikalı hasta ve 310 Belçikalı sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada Thoelen ve arkadaşları, CCR5 delta 32 allel sıklığını araştırmışlardır. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında allel sıklığı açısından fark bulunmamıştır (sırasıyla 0.080 ve 0.119, $p=0.09$) (69).

Glas ve arkadaşları, Münih'te 62 HCV enfeksiyonu bulunan hasta ve 119 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada HCV enfeksiyonu ile CCR5 delta 32 delesyonu arasındaki ilişkiyi ve tedavi yanıtı ile korelasyonunu araştırmışlardır. CCR5 delta 32 allel sıklığı bakımından hasta grubu ile kontrol grubu arasında fark bulunmamıştır (sırasıyla %13.7 ve %11.3, $p=0.3106$). Hasta grubunda tedaviye yanıt verenler ile vermeyenler arasında da CCR5 delta 32 allel sıklığı bakımından fark bulunmamıştır (sırasıyla %13.5 ve %11.9, $p=0.5846$) (70).

Sunulan çalışmada hasta gruplarındaki ve kontrol grubundaki katılımcıların tamamı CCR5 geni için homozigot doğal tip olarak bulunmuştur. Karakaya ve arkadaşları (71) Türkiye'nin 7 farklı coğrafi bölgesinden 400 katılımcı ile yaptıkları

çalışmada Türkiye'deki CCR5 delta 32 allel sıklığını %2.62 olarak bulmuşlardır, homozigot mutant allele rastlanmamıştır. En yüksek sıklık İç Anadolu Bölgesi'nde %7.26 olarak bildirilmiş iken Marmara Bölgesi'nden mutasyon bildirilmemiştir. Sözü edilen çalışmada da genel olarak mutant allel sıklığı Batı Avrupa ile uyumlu olarak kuzeyden güneye doğru gidildikçe azalma göstermiştir.

Sunulan çalışmada hasta grubunun %56'sı kadın hastalardan oluşmaktaydı. Kadın hastalar yanıtız hastaların %52.9'unu oluştururken, yanıtlı hastaların ise %57.6'sını oluşturmaktaydı. Kadın hastaların %67.9'u yanıtlı hasta grubunda bulunmakta iken, erkek hastaların %42.9'u yanıtlı hasta grubunda bulunmaktaydı. Kau ve arkadaşlarının (72) yaptığı sistematik derleme çalışmasında; standart interferon ve ribavirin tedavisi alan HCV enfeksiyonlu hastalarda SVR ile kadın cinsiyet arasında anlamlı ilişki bulunurken, pegile edilmiş interferon ve ribavirin tedavisi alanlarda tedavi yanıtı ile cinsiyet arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır.

İnterferon tedavisine yanıtta viral genotipin SVR için en önemli prognostik faktör olduğu bilinmektedir. Genel olarak interferon tedavisinde HCV genotip 1 ile enfekte hastalarda HCV genotip 2 ve 3 ile enfekte hastalara göre daha düşük oranlarda SVR elde edilmektedir . SVR elde edilme oranları HCV genotip 2 ve 3 için %65 olarak bildirilirken, HCV genotip 1 için %30 olarak bildirilmektedir (34).

Sunulan çalışmada HCV genotipi ile ilgili verisi bulunan 31 hastadan 29 hastanın HCV genotipi tip 1b, 1 hastanın HCV genotipi tip 2b, 1 hastanın HCV genotipi tip 3a olarak tespit edilmiştir. Tip 1b ile enfekte 29 hastanın 10'unda tedaviye yanıt alınmazken 3 hastada EVR, 1 hastada kısmi EVR, 2 hastada ETR, 13 hastada SVR, tip 2b ile enfekte 1 hastada SVR, tip 3a ile enfekte 1 hastada ise EVR elde edilmiştir. Çalışmamıza katılan hastaların bölgemiz için beklendiği şekilde baskın olarak HCV genotip 1 ile enfekte olması sebebi ile genotipler arası yanıt karşılaştırması yapılamamıştır.

SONUÇLAR

1. Değerlendirmeye alınan örneklerin 44'ü kadınlardan (%56.4; 28 hasta, 16 sağlıklı kontrol), 34'ü erkeklerden (%43.6; 22 hasta, 12 sağlıklı kontrol) toplandı.
2. Hastaların 33'ü (%66) tedaviye yanıtı iken, 17 hasta (%34) tedaviye yanıtı sızdı.
3. Hem yanıtı hasta grubunda hem de yanıtı sız hasta grubunda CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin (sırasıyla $p=0.022$ ve $p=0.039$) ve CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.021$) yüzde oranı kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu.
4. Yanıtı hasta grubu ve yanıtı sız hasta grubu arasında CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin ve CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzdesi açısından anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.971$ ve $p=0.872$).
5. Yanıtı ve yanıtı sız hasta gruplarında serum CCL3 (sırasıyla $p=0.011$ ve $p=0.001$), CXCL9 (sırasıyla $p=0.020$ ve $p=0.008$) ve CXCL10 (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.001$) düzeyleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunurken, serum CCL4 (sırasıyla $p=0.099$ ve $p=0.053$) ve CCL5 (sırasıyla $p=0.090$ ve $p=0.782$) düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.
6. Serum CCL3, CCL4, CCL5 ve CXCL9 düzeyleri açısından yanıtı ve yanıtı sız hasta grupları arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.358$, $p=0.800$, $p=0.489$ ve $p=0.713$).
7. Serum CXCL10 düzeyleri yanıtı sız hasta grubunda yanıtı hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.001$).
8. Hastalar viremi varlığına göre gruplandırıldığında hem CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzdesi açısından hem de CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzdesi açısından viremik olan ve viremik olmayan hastalar arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.494$ ve $p=0.990$).

9. Serum CCL3, CCL4 ve CCL5 düzeyleri açısından viremik hastalarla viremik olmayan hastalar arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.417$, $p=0.442$ ve $p=0.211$).
10. Serum CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri viremik hastalarda viremik olmayan hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.008$ ve $p<0.001$).
11. Hastalar HCV-RNA düzeyine göre (2×10^6 IU/mL değerinin üzerinde veya altında olmasına göre) gruplandırıldığında hem CCR5⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzdesi açısından hem de CXCR3⁺-CD8⁺ lenfositlerin yüzdesi açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.265$ ve $p=0.180$).
12. Hastalar HCV-RNA düzeyine göre gruplandırıldığında serum CCL3, CCL4, CCL5 ve CXCL9 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.677$, $p=0.723$, $p=0.288$ ve $p=0.423$).
13. Serum CXCL10 düzeyleri HCV-RNA düzeyi 2×10^6 IU/mL değerinin üzerinde olan hastalarda, 2×10^6 IU/mL değerinin altında olanlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.022$).
14. Hasta gruplarındaki ve kontrol grubundaki katılımcıların tamamı CCR5 geni için homozigot doğal tip olarak bulundu.
15. HCV genotipi ile ilgili verisi bulunan 31 hastadan 29 hastanın HCV genotipi tip 1b, 1 hastanın HCV genotipi tip 2b, 1 hastanın HCV genotipi tip 3a olarak tespit edildi.

KAYNAKLAR

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359–62.
2. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int*. 2009;29(S1):74–81.
3. Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine*. 2007;39(1):50–62.
4. Larrubia J-R, Martinez SB, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parra T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2008;14(47):7149–59.
5. Barut HŞ, Günel Ö. Dünyada ve ülkemizde hepatit C epidemiyolojisi. *Klinik Derg*. 2009;22(2):38–43.
6. Lai CL, Ratziu V, Yuen M-F, Poynard T. Viral hepatitis C. *Lancet*. 2003;362(9401):2095–100.
7. Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. *J Hepatol*. 2006;45(4):607–16.
8. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(9):558–67.
9. Lever C, Nash KL. Hepatitis C. *Medicine*. 2011;39(9):550–5.
10. Wejstal R. Sexual transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol*. 1999;31(Suppl. 1):92–5.
11. Cavalheiro NP. Sexual transmission of hepatitis C. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49(5):271–7.
12. Sánchez-Tapias JM. Nosocomial transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol*. 1999;31(Suppl. 1):107–12.
13. Jadoul M, Poignet J-L, Geddes C, Locatelli F, Medin C, Krajewska M, et al. The changing epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection in haemodialysis: European multicentre study. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(4):904–9.
14. Vallet-Pichard A, Fontaine H, Mallet V, Pol S. VIRAL hepatitis in solid organ transplantation other than liver. *J Hepatol*. 2011;55(2):474–82.

15. Deuffic-Burban S, Delarocque-Astagneau E, Abiteboul D, Bouvet E, Yazdanpanah Y. Blood-borne viruses in health care workers: prevention and management. *J Clin Virol.* 2011;52(1):4–10.
16. Bevilacqua E, Fabris A, Floreano P, Pembrey L, Newell M-L, Tovo P-A, et al. Genetic factors in mother-to-child transmission of HCV infection. *Virology.* 2009;390(1):64–70.
17. Ackerman Z, Ackerman E, Paltiel O. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a systematic review. *J Viral Hepat.* 2000;7(2):93–103.
18. Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editor(s). *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott-Raven; 2007. p. 1101–52.
19. Simmonds P, Becher P, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Meyers G, Monath T, Pletnev A, Rice CM, Stiasny K, Thiel HJ, Weiner A, Bukh J. Part II: The Viruses. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editor(s). *Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Inc.; 2012. p. 1014–20.
20. Joyce MA, Tyrrell DLJ. The cell biology of hepatitis C virus. *Microbes Infect.* 2010;12(4):263–71.
21. Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S, Baumert TF. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol.* 2011;54(3):566–76.
22. Moradpour D, Penin F, Rice C. Chapter 7 - Replication of hepatitis C virus. In: Boyer T, Manns M, Sanyal A, editor(s). *Zakim and Boyer's Hepatology.* Elsevier Inc.; 2012. p. 97–110.e4.
23. Morton TA, Kelen GD. Hepatitis C. *Ann Emerg Med.* 1998;31(3):381–90.
24. Pawlotsky J-M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol.* 2004;12(2):96–102.
25. Bouchard MJ, Navas-Martin S. Hepatitis B and C virus hepatocarcinogenesis: lessons learned and future challenges. *Cancer Lett.* 2011;305(2):123–43.
26. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) Infection. *Int J Med Sci.* 2006;3(2):47–52.
27. Alberti A, Vario A, Ferrari A, Pistis R. Review article: chronic hepatitis C - natural history and cofactors. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22(Suppl. 2):74–8.

28. Tillmann HL, McHutchison JG. Chapter 31 - Hepatitis C. In: Boyer T, Manns M, Sanyal A, editor(s). *Zakim and Boyer's Hepatology*. Elsevier Inc.; 2012. p. 564–598.e6.
29. Ascione A, Tartaglione T, Costanzo GG Di. Natural history of chronic hepatitis C virus infection. *Dig Liver Dis*. 2007;39(Suppl 1):S4–7.
30. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci*. 2006;3(2):35–40.
31. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. *Hepatology*. 2004;39(4):1147–71.
32. Yasin T, Riley TR, Schreiber IR. Current treatment of choice for chronic hepatitis C infection. *Infect Drug Resist*. 2011;411–8.
33. Cornberg M, Hardtke S, Port K, Manns MP, Wedemeyer H. Hepatitis C standard of care. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H, editor(s). *Short Guide to Hepatitis C*. Flying Publisher & Kamps; 2012. p. 34–57.
34. Munir S, Saleem S, Idrees M, Tariq A, Butt S, Rauff B, et al. Hepatitis C treatment: current and future perspectives. *Virol J*. 2010;7(1):296–301.
35. Flamm S. Chronic hepatitis C virus infection. *JAMA*. 2003;289(18):2413–7.
36. Tai AW, Chung RT. Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J Hepatol*. 2009;50(2):412–20.
37. Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A. Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res*. 2011;317(5):575–89.
38. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997;90(3):909–28.
39. Burke-Gaffney A, Brooks AVS, Bogle RG. Regulation of chemokine expression in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2002;38(5):283–92.
40. Zeremski M, Petrovic LM, Talal AH. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*. 2007;14(10):675–87.
41. Borish L, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2):460–75.
42. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(6):1185–99.

43. Murphy PM. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):227–9.
44. Çağlar M, Kansu E. Kemokinler, kemokin reseptörleri ve inflamasyon. *ANKEM Derg.* 2004;18(Ek 2):164–8.
45. Moser B, Willmann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(Suppl 2):ii84–9.
46. Kunkel SL, Godessart N. Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics. *Autoimmun Rev.* 2002;1(6):313–20.
47. Ahlenstiel G, Berg T, Woitas RP, Grünhage F, Iwan A, Heß L, et al. Effects of the CCR5-Δ32 mutation on antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2003;39(2):245–52.
48. Shapiro HM, Perlmutter NG. Personal cytometers: slow flow or no flow? *Cytometry A.* 2006;69(A):620–30.
49. Shapiro HM. Buying Flow Cytometers. In: *Practical Flow Cytometry.* John Wiley and Sons Inc.; 2003. p. 411–40.
50. Roseiro C, Reis A, Lopes T. Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. *Trends Biotechnol.* 2012;30(4):225–32.
51. Immunofluorescent staining of cell surface molecules for flow cytometric analysis of immune function. In: *Techniques for Immune Function Analysis Application Handbook.* BD Biosciences; 2009. p. 11–30.
52. Larrubia J-R, Calvino M, Benito S, Sanz-de-Villalobos E, Perna C, Pérez-Hornedo J, 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.
53. Perney P, Turriere C, Portalès P, Rigole H, Psomas C, Blanc F, et al. CXCR3 expression on peripheral CD4+ T cells as a predictive marker of response to treatment in chronic hepatitis C. *Clin Immunol.* 2009;132(1):55–62.
54. Curbishley SM, Eksteen B, Gladue RP, Lalor P, Adams DH. CXCR 3 activation promotes lymphocyte transendothelial migration across human hepatic endothelium under fluid flow. *Am J Pathol.* 2005;167(3):887–99.
55. Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol.* 1999;163(11):6236–43.

56. Willberg C, Barnes E, Klenerman P. HCV immunology-death and the maiden T cell. *Cell Death Differ.* 2003;10(Suppl 1):39–47.
57. Zeremski M, Hooker G, Shu MA, Winkelstein E, Brown Q, Des Jarlais DC, et al. Induction of CXCR3- and CCR5-associated chemokines during acute hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2011;55(3):545–53.
58. Florholmen J, Kristiansen MG, Steigen SE, Sørbye SW, Paulssen EJ, Kvamme JM, et al. A rapid chemokine response of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β and the regulated on activation, normal T expressed and secreted chemokine is associated with a sustained virological response in the treatment of chronic hepatitis C. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2):204–9.
59. Apolinario A, Diago M, Iacono O Lo, Lorente R, Perez C, Majano PL, 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(5):551–62.
60. Lee S, Varano J, Flexman J, Cheng W, Watson MV, Rossi E, et al. Decreased IP-10 and elevated TGF β 1 levels are associated with viral clearance following therapy in patients with hepatitis C virus. *Dis Markers.* 2010;28(5):273–80.
61. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, Brown QB, Yee HT, Kinkhabwala M, et al. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2008;48(5):1440–50.
62. Lagging M, Romero AI, Westin J, Norkrans G, Dhillon AP, Pawlotsky J-M, et al. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology.* 2006;44(6):1617–25.
63. Romero AI, Lagging M, Westin J, Dhillon AP, Dustin LB, Pawlotsky J-M, et al. Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2006;194(7):895–903.
64. Fattovich G, Covolo L, Bibert S, Askarieh G, Lagging M, Clément S, et al. IL28B polymorphisms, IP-10 and viral load predict virological response to therapy in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(10):1162–72.
65. Wald O, Pappo O, Ari ZB, Azzaria E, Wiess ID, Gafnovitch I, et al. The CCR5 Δ 32 allele is associated with reduced liver inflammation in hepatitis C virus infection. *Eur J Immunogenet.* 2004;31(6):249–52.
66. Ruiz-Ferrer M, Barroso N, Antiñolo G, Aguilar-Reina J. Analysis of CCR5- Δ 32 and CCR2-V64I polymorphisms in a cohort of Spanish HCV patients

using real-time polymerase chain reaction and fluorescence resonance energy transfer technologies. *J Viral Hepat.* 2004;11(4):319–23.

67. Woitas RP, Ahlenstiel G, Iwan A, Rockstroh JK, Brackmann HH, Kupfer B, et al. Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5- Δ 32/ Δ 32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology.* 2002;122(7):1721–8.
68. Wasmuth HE, Werth A, Mueller T, Berg T, Dietrich CG, Geier A, et al. CC chemokine receptor 5 Δ 32 polymorphism in two independent cohorts of hepatitis C virus infected patients without hemophilia. *J Mol Med.* 2004;82(1):64–9.
69. Thoelen I, Verbeeck J, Wollants E, Maes P, Robaey G, Matheï C, et al. Frequency of the CCR5- Δ 32 mutant allele is not increased in Belgian hepatitis C virus-infected patients. *Viral Immunol.* 2005;18(1):232–5.
70. Glas J, Török H, Simperl C, et al. The Δ 32 mutation of the chemokine-receptor 5 gene neither is correlated with chronic hepatitis C nor does it predict response to therapy with interferon- α and ribavirin. *Clin Immunol.* 2003;108(1):46–50.
71. Karakaya G. Türkiye’ de HIV’ e direnç ile ilgili mutant CCR5- Δ 32 allel sıklığının araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Kırıkkale: Kırıkkale Üniversitesi; 2010.
72. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol.* 2008;49(4):634–51.