

Hepatit C Virus Enfeksiyonlu Hastalarda Pegile İnterferon-Ribavirin Tedavisi Yanıtı ile Kemokin Ligand ve Reseptör Düzeyleri İlişkisi[§]

Orçun ZORBOZAN*, İlknur KALELİ*, Hüseyin TURGUT**

*Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

**Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

ÖZ

Amaç: Kronik hepatit C virus (HCV) enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan antiviral ajanlar ciddi yan etkilere sahiptir. HCV-RNA tedavi yanıtını değerlendirmek için kullanılmaktadır. HCV genotipi tedavi süresi ve dozunun belirlenmesinde kullanılmaktadır, ancak henüz tedavi yanıtını öngörmek için bir belirteç bulunmamaktadır. Bu çalışma kemokinler, kemokin reseptörleri ve delta-32 delesyonu ile HCV enfeksiyonunda tedavi yanıtı arasındaki ilişkiyi araştırmak için tasarlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 50 kronik HCV ile enfekte hasta ile 28 sağlıklı kontrol dâhil edilmiştir. Serum CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri ticari ELISA kiti ile ölçülmüştür. Periferik kan CD8+ hücrelerin CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonları akım sitometri tekniği ile gösterilmiştir. Delta-32 delesyonu real-time PCR ile araştırılmıştır.

Bulgular: Hastalar tedavi yanıtına göre iki gruba ayrılmıştır. CCR5+-CD8+ ve CXCR3+-CD8+ lenfositlerin yüzdeleri her iki hasta grubunda da kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.021$), ancak hasta grupları arasında anlamlı fark yoktur ($p=0.872$). CCL4 ve CCL5 düzeyleri yanıtlı hastalar, yanıtız hastalar ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık göstermemektedir. CCL3, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri ise hasta gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. CCL3 ve CXCL9 düzeyleri yanıtlı ve yanıtız hastalar arasında anlamlı fark göstermezken, CXCL10 düzeyi yanıtız hasta grubunda yanıtlı hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ($p=0.001$).

Sonuç: Bu çalışmanın bulgularına göre kronik HCV enfeksiyonunda periferik kan CD8+ hücrelerin CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonu artmıştır, ancak tedaviye yanıtlı ve yanıtız hasta grupları arasında fark yoktur; serum CCL3, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri HCV enfeksiyonunda artmıştır ancak yalnızca CXCL10 tedavi yanıtı ile ilişkili bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Delta 32, kemokinler, konak-virus ilişkileri

ABSTRACT

Relationship Between Pegylated Interferon-Ribavirin Treatment Response and Chemokine Ligand and Receptor Levels in Hepatitis C Virus Infected Patients

Objective: Antiviral agents used in chronic HCV infection treatment have serious side effects. HCV-RNA is used to evaluate treatment response. HCV genotype is used for determining duration and dose of treatment but there is no definite predictor of treatment response yet. This study is designed to investigate the relationship between chemokines, chemokine receptors, delta-32 deletion and HCV infection treatment response.

Material and Methods: Fifty chronic HCV-infected patients and 28 healthy controls were included in the study. Serum CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 and CXCL10 levels were measured by commercial ELISA kits. CCR5 and CXCR3 surface expressions of peripheral blood CD8+ cells were evaluated by flow-cytometry. Delta-32 deletions were evaluated by real-time PCR.

Results: Patients were divided into two groups according to their treatment responses. In both of the patient groups, percentages of CCR5+-CD8+ lymphocytes and CXCR3+-CD8+ lymphocytes were higher than those of the control ($p=0.001$, $p=0.021$, respectively); but there was no significant difference between patient groups ($p=0.872$). CCL3, CXCL9 and CXCL10 levels were significantly higher in patient groups than those of the control. CCL4 and CCL5 levels were not significantly different among responders, non-responders and contro subjects. CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL9 levels were not significantly different between responder and non-responder patients, while CXCL10 levels in non-responders were higher than those of responders ($p=0.001$).

Conclusion: According to the findings of this study, CCR5 and CXCR3 surface expressions of CD8+ cells in the peripheral blood increased in chronic hepatitis C but there was no difference between responder and non-responder patient groups; CCL3, CXCL9 and CXCL10 levels increased in HCV infection, however, only CXCL10 predicted the treatment response.

Keywords: Delta 32, chemokines, host-virus interactions

Alındığı tarih: 07.02.2017

Kabul tarihi: 24.03.2017

Yazışma adresi: Orçun Zorbozan, Ege Üniversitesi Hastanesi, Poliklinikler Binası Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova 35080 İzmir

e-posta: orcun-zorbozan@hotmail.com

Tel: (0232) 390 49 16

[§] Bu çalışma 24. ECCMID Kongresi'nde (10-13 Mayıs 2014, Barselona, İspanya) poster bildiri (P1939) olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

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⁽¹⁻⁵⁾. HCV'ye özgü T hücrelerin enfeksiyonu kontrol altına alması için, kemokinler ve kemokin reseptörleri arasındaki ilişki esansiyeldir. Kazanılmış immün yanıt 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, kronik fazında ise 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 yarar sağlamışlardır⁽⁶⁾. Virusun kendisinin yaptığı tahribatın yanı sıra kronik HCV enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan antiviral ajanlar da ciddi yan etkilere sahiptir. HCV enfeksiyonunda güncel tedavi yaklaşımında pegile interferon-ribavirin tedavisi yerine direkt etkili ajanlar (DEA) tercih edilmeye başlanmıştır. DEA; NS3/4A proteaz inhibitörleri, NS5A inhibitörleri ve NS5B polimeraz inhibitörlerini içerir. NS3/4A proteaz inhibitörleri birinci nesil DEA sınıfındadırlar ve HCV replikasyonu için gerekli olan poliprotein işlenmesini engeller. Bugüne kadar mevcut olan ilaçlar beseprevir, telaprevir, simeprevir, asunaprevir ve paritaprevirdir. Daclatasvir, ledipasvir veya ombitasvir gibi NS5A inhibitörleri, çeşitli HCV genotiplerini etkiler ve diğer DEA sınıfları ile kombinasyon hâlinde sinerjik bir etki gösterirler⁽⁷⁾. HCV genotipi tedavi süresinin ve dozunun belirlenmesinde kullanılmaktadır, ancak henüz teda-

vi yanıtını öngördüren bir belirteç kullanımında değildir. Bu çalışmada, kemokinler, kemokin reseptörleri ve delta-32 delesyonu ile HCV enfeksiyonunda tedavi yanıtı arasındaki ilişki araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta ve Kontrol Grupları

Mart 2012-Ekim 2012 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran 56 kronik HCV enfeksiyonlu hasta ve 28 sağlıklı kontrol çalışmaya alındı. Kronik hastalık (diyabet, hipertansiyon), alerjik hastalık, HCV enfeksiyonu dışındaki karaciğer hastalıkları varlığı ile kriyoglobulinemi ve tirodit varlığı dışlama kriteri olarak kullanıldı. Altı hasta tedavinin kesilmesi nedeniyle çalışma dışında bırakıldı. Tüm hastalarda uygulanan tedavi standart pegile interferon ve ribavirin kombinasyonu şeklindeydi. Alanin-aminotransferaz (ALT) ölçümleri Cobas 8000 Otoanalizörü c501 modülü (Roche Diagnostics, ABD) ile yapıldı. HCV viral yük ölçümleri Cobas AmpliPrep/ Cobas TaqMan HCV Quantitative Test (Roche Diagnostics, ABD) kullanılarak yapıldı. Tüm katılımcılardan aydınlatılmış onam alındı.

Örneklerin Toplanması

Çalışmaya alınan tüm katılımcılardan bir 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 µL ayrılarak -20°C'de saklandı. EDTA'lı tüpteki tam kanın 200 µL'si akım sitometri çalışmaları için hemen kullanıldı, kalan tam kan ise PCR analizi için -20°C'de saklandı.

Kemokin Ligand Düzeylerinin Ölçülmesi

CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 (Invitrogen,

ABD) ve CXCL9 (Raybiotech, ABD) düzeylerinin ölçümü ticari ELISA kitleri kullanılarak yapıldı. Analiz basamakları üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Tüm kuyucukların absorbansı ELx808 ELISA okuyucusunda (BioTek Instruments, ABD) 450 nm dalga boyunda kaydedildi. Standart eğriler Gen5 Veri Analiz Yazılımı (BioTek Instruments, ABD) ile oluşturuldu.

Kemokin Reseptör Düzeylerinin Ölçülmesi

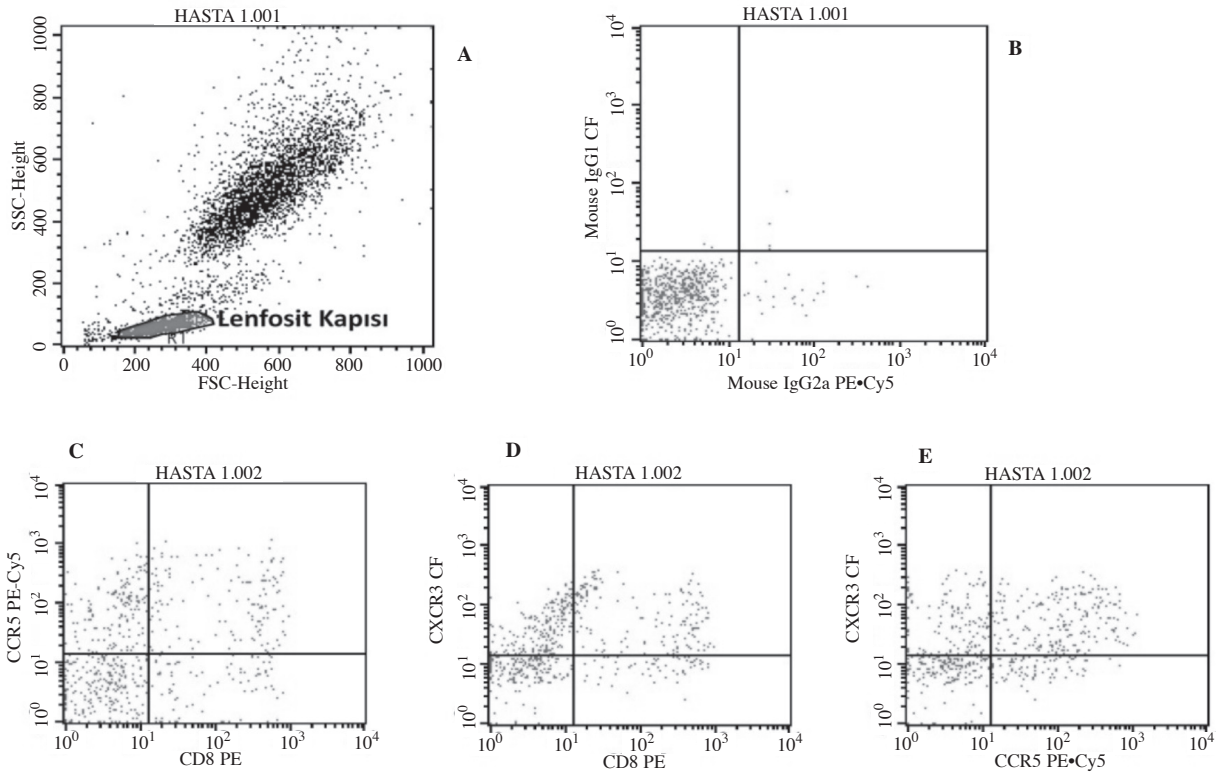
Periferik kan CD8+ hücrelerin CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonları akım sitometri ile üretici firma önerilerine uygun olarak gerçekleştirildi. CCR5-Cy5 (BD Pharmingen), CXCR3-CF (LifeSpan BioSciences), CD8-PE (Imgenex) monoklonal antikorları ve fare PE-Cy5 IgG2a, fare CF IgG1 izotip kontrolleri kullanıldı.

Hücrelerin inkübasyonu ve yıkaması üretici

firma önerilerine göre yapıldı. İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra hücreler FACSCalibur (Becton-Dickinson, ABD) cihazında akım sitometri işlemine tabi tutuldu. Her tüp için 10000 olay kaydedildi ve Cell Quest Pro yazılımı ile analiz edildi. Kaydedilen olaylar forward scatter/side scatter, IgG2a-PE-Cy5/IgG1-CF, CD8-PE/CCR5-PE-Cy5 ve CD8-PE/CXCR3-CF diagramlarında analiz edildi. “Forward scatter/side scatter” diagramında lenfosit kapısı alındı. Seçilen lenfositler ile izotip kontrol diagramında kadranslar belirlendi. CD8+ hücrelerin kemokin reseptör düzeyleri CD8-PE/CCR5-PE-Cy5 ve CD8-PE/CXCR3-CF diagramlarında sağ üst kadrandaki hücrelerin yüzdesi olarak belirlendi (Şekil 1).

CCR5 Delta-32 Delesyonunun Tespiti

CCR5 delta-32 delesyonunun tespiti real-time PCR ile yapıldı. Genomik DNA Roche® High



Şekil 1. Akım sitometri analiz grafikleri A. “Forward Scatter-Side Scatter” grafiği, B. İzotip kontroller, C. CD8-CCR5 grafiği, D. CD8-CXCR3 grafiği.

Pure PCR Template Preparation Kit kullanılarak tam kandan elde edildi. DNA ekstraksiyonu üretici firma önerilerine göre yapıldı. PCR sırasında ABD Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI: National Center for Biotechnology Information) veritabanında yer alan insana ait NM000579.3 numaralı “chemokine (C-C motif) receptor 5” geni hedeflendi. D32-F(5′-ACCTGCAGCTCT-CATTTTCC-3′) ve D32-R(5′-CCAGCCCCA-AGATGACTATC-3′) DNA primerleri ile LightCycler™ sistemi ve “LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I” kullanıldı.

İşlem amplifikasyon ve melting curve analizini içeren iki aşama şeklinde gerçekleştirildi. 95°C’de 10 dakika ön inkübasyonu takiben 45 döngü amplifikasyon yapıldı (95°C’de 10 sn., 60°C’de 10 sn. ve 72°C’de 10 sn.). Altmışbeş °C’den 95°C’ye 0.1°C/sn. eğimle “melting curve” elde edilirken oluşan floresans 530 nm dalga boyunda ölçüldü. 32 baz çiftlik delesyonu içeren amplikon, delesyon içermeyen amplikona göre 2°C daha düşük erime sıcaklığına sahipti.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 16.0 (Chicago, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. Normal dağılım gösteren veriler aritmetik ortalama \pm standart sapma ($\bar{x} \pm SD$), normal dağılım göstermeyen veriler ise ortanca ve çeyreklikler arası fark (m; IQR) olarak belirtildi. Çalışmadaki değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi.

Değişkenlerin tedavi yanıtı üzerindeki etkisini değerlendirmek için çok değişkenli lojistik regresyon analizi uygulandı. 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 düzeltmeli Mann-Whitney U testi uygulandı. Ölçümsel olmayan değişkenler için ki-kare testi kullanıldı.

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

Bu araştırma için Pamukkale Üniversitesi Etik Kurulu onayı alınmıştır (02.11.2010/07).

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 2011TPF033).

BULGULAR

Çalışmaya 28 kadın ve 22 erkek olmak üzere toplam 50 hasta dâhil edildi. Kan örnekleri yedi hastada tedavinin başlandığı gün, 43 hastada tedavi başladıktan sonraki iki hafta içerisinde alındı. Hastalar tedavi yanıtına göre iki gruba ayrıldı. Tedavi yanıtının değerlendirilmesi tedavi sırasında ve sonrasında HCV viral yüküne göre yapıldı. Yanıtlı grup 19’u kadın ve 14’ü erkek olmak üzere 33 hastadan oluşuyordu. Yanıtlı hastaların 26’sında kalıcı virolojik yanıt (sustained virological response; SVR), dördünde erken virolojik yanıt (early virological response; EVR), birinde kısmi EVR ve ikisinde tedavi sonu yanıtı (end of treatment response; ETR) elde edildi. Yanıtsız hasta grubu ise dokuz kadın ve sekiz erkek olmak üzere 17 hastadan oluşuyordu. Yanıtsız hastaların 11’inde hiç yanıt görülmezken, altısında relaps izlendi. Kontrol grubu ise 16 kadın ve 12 erkek olmak üzere 28 kişiden oluşuyordu. Yanıtsız hastaların %52.9’u, yanıtlı hastaların ise %57.6’sı kadın hastalardı (Tablo 1). Kadın hastaların %32.1’i ve erkek hastaların %57.1’i yanıtsızdı.

Tablo 1. Hasta grupları ve kontrol grubunun demografik özellikleri ile ALT, HCV-RNA, kemokin ve kemokin reseptör düzeyleri.

	Yanıtlı hastalar n=33	Yanıtsız hastalar n=17	Kontrol grubu n=28
Yaş ($\bar{x}\pm SD$ yıl)	47.7 \pm 9.9	50.2 \pm 9.58	52 \pm 12.3
Erkek (%)	42.4	47.1	42.9
Kadın (%)	57.6	52.9	57.1
ALT (m (IQR) U/L)	17 (12.9)	35 (63.5)	6 (1.9)
HCV-RNA (m (IQR) kopya/ml)	3.9x10 ¹ (12.7x10 ¹)	1.03x10 ⁶ (4.08x10 ⁶)	-
CCR5+-CD8+ (%)	15.59	16.01	11.36
CXCR3+-CD8+ (%)	23.20	22.14	16.15
CCL3 ($\bar{x}\pm SD$ pg/ml)	3.64 \pm 4.73	5.09 \pm 3.45	0.94 \pm 1.10
CCL4 ($\bar{x}\pm SD$ pg/ml)	59.87 \pm 20.52	63.75 \pm 20.50	48.94 \pm 20.15
CCL5 ($\bar{x}\pm SD$ ng/ml)	59.53 \pm 81.38	40.94 \pm 17.29	29.78 \pm 12.61
CXCL9 ($\bar{x}\pm SD$ ng/ml)	2.07 \pm 2.57	2.55 \pm 2.44	0.63 \pm 0.30
CXCL10 (m (IQR) pg/ml)	169.75 (132.47)	398.04 (302.49)	92.24 (61.76)

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

Hasta gruplarından HCV genotipi ile ilgili verilerine ulaşılan 31 hastadan 29 hastanın HCV genotipi tip 1b, bir hastanın HCV genotipi tip 2b, bir hastanın HCV genotipi tip 3a olarak tespit edildi. Genotip 1b baskınlığı nedeniyle farklı genotiplere göre istatistiksel analiz gerçekleştirilemedi.

Tedavi rejimi 34 hastada tek başına pegile interferon, 16 hastada pegile interferon-ribavirin kombinasyonu şeklindeydi. Farklı tedavi rejimlerine göre tedavi yanıtlarında anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.101).

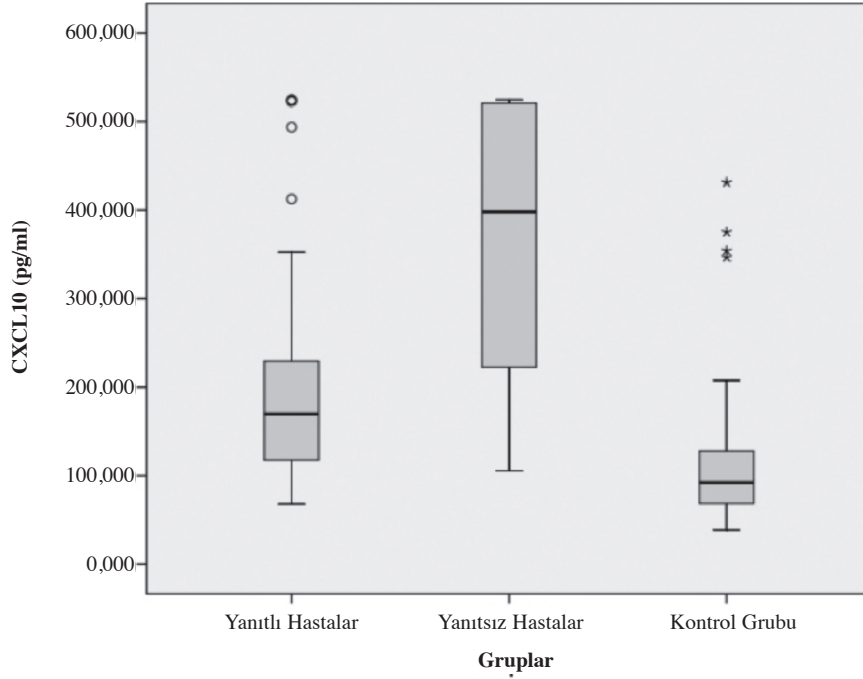
Kolmogorov-Smirnov testine göre normal dağılım göstermeyen ALT, HCV-RNA ve CXCL10 düzeyleri m; IQR biçiminde belirtilirken, diğer tüm veriler $\bar{x}\pm SD$ biçiminde belirtildi (Tablo 1).

Hasta ve kontrol grupları arasında yaş (p=0.335) ve cinsiyet (p=0.948) açısından anlamlı fark yoktu (Tablo 1).

Yanıtlı hastalarda ve yanıtsız hastalarda CCR5+-CD8+ lenfositlerin yüzdesi kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0.022 ve p=0.039) ancak yanıtlı ve yanıtsız hastalar arasında anlamlı fark yoktu (p=0.971) (Tablo 1). Benzer şekilde yanıtlı hastalarda ve yanıtsız hastalarda CXCR3+-CD8+ lenfositlerin yüzdesi

kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0.001 ve p=0.021), ancak yanıtlı ve yanıtsız hastalar arasında anlamlı fark yoktu (p=0.872) (Tablo 1).

Serum CCL3 düzeyleri yanıtlı ve yanıtsız hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0.011 ve p=0.001), ancak yanıtlı ve yanıtsız hastalar arasında anlamlı fark yoktu (p=0.358) (Tablo 1). Serum CCL4 düzeyleri açısından hem yanıtlı ve yanıtsız hasta grupları ile kontrol grubu arasında (sırasıyla p=0.099 ve p=0.053) hem de yanıtlı ve yanıtsız hasta grupları arasında (p=0.800) anlamlı fark yoktu (Tablo 1). Benzer şekilde serum CCL5 düzeyleri açısından hem yanıtlı ve yanıtsız hasta grupları ile kontrol grubu arasında (sırasıyla p=0.090 ve p=0.782) hem de yanıtlı ve yanıtsız hasta grupları arasında (p=0.489) anlamlı fark yoktu (Tablo 1). Serum CXCL9 düzeyleri yanıtlı ve yanıtsız hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0.020 ve p=0.008), ancak yanıtlı ve yanıtsız hastalar arasında anlamlı fark yoktu (p=0.713) (Tablo 1). Serum CXCL10 düzeyleri yanıtlı ve yanıtsız hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla p=0.001 ve p=0.001). Serum CXCL10 düzeyleri yanıtsız hastalarda yanıtlı hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.001) (Tablo 1) (Şekil 2).



Şekil 2. Hasta grupları ve kontrol grubunda serum CXCL10 düzeylerini gösteren grafik.

Hastalar tedavi rejimine göre gruplandırıldığında tekli tedavi grubunda yanıtı ve yanıtı olmayan hastalar arasında CXCL10 düzeyleri açısından anlamlı fark yok iken ($p=0.995$), kombinasyon tedavisi alan yanıtı olmayan hastalarda yanıtı olan hastalara CXCL10 düzeyleri anlamlı olarak yüksekti ($p=0.001$).

Korelasyon analizlerinde CCL3 ($r=0.257$), CCL4 ($r=0.316$) ve CXCL10 ($r=0.551$) ALT ile anlamlı korelasyon gösterirken (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.004$ ve $p=0.001$) yalnızca CXCL10 ($r=0.652$) HCV-RNA ile anlamlı korelasyon gösterdi ($p=0.001$).

CCR5 delta-32 delesyonunun saptanması için yapılan real time PCR sonucunda tüm hasta ve kontrol örnekleri “wild type” olarak tespit edildi, delesyon saptanmadı.

TARTIŞMA

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. 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⁽⁸⁾. 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. 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⁽⁹⁾.

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⁽⁶⁾. 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⁽⁸⁾. Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğere baskın olarak Th1 ve Tc1 tipindeki lenfositler göç etmektedirler. Bu tipteki lenfositler yüzeylerinde CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptörlerini yüksek miktarlarda eksprese etmektedirler. Karaciğerde salgılanan ELR“-”CXCL 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⁽⁶⁾.

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⁽¹⁰⁾. İnflamasyondaki rolünün yanı sıra bazı kemokinlerin ve reseptörlerinin antiviral tedavi yanıtının iyi bir göstergesi de olan bir konak faktörü olabileceğine vurgu

yapan çalışmalar bulunmaktadır⁽⁸⁾. Sunulan araştırmada da, HCV ile enfekte hastalarda kemokin reseptörleri, bu reseptörlerle ilişkili kemokinler ve CCR5 delta-32 delesyonu ile HCV enfeksiyonunun tedavi yanıtı arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Sunulan araştırmada, hem yanıtli hasta grubunda hem de yanıtız 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⁽⁵⁾. Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğere Th1 ve Tc1 tipindeki lenfositler baskın olarak göç etmektedirler ve bu tipteki lenfositler yüzeylerinde CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptörlerini yoğun olarak eksprese etmektedirler⁽⁶⁾. Bu nedenlere bağli olarak sunulan araştırmadaki hasta grubunda da periferik kanda CD8+ lenfositlerin CCR5 ve CXCR3 kemokin reseptör ekspresyonlarının yoğun olmasını beklemekteydik. Perney ve ark.⁽¹¹⁾ da periferik kanda CD4+ T hücrelerde CCR5 ve CXCR3 ekspresyonunu hasta grubunda sağlıklı kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Larrubia ve ark.’nın⁽¹²⁾ yaptığı çalışma ise, çalışmamızın sonuçları ile çelişmektedir. Larrubia ve ark.’nın⁽¹²⁾ 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 bağli 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 araştırmada yanıtlı hasta grubu ve yanıtız hasta grubu arasında CCR5+-CD8+ lenfositlerin ve CXCR3+-CD8+ lenfositlerin yüzde oranları açısından anlamlı fark bulunmadı. Literatürde sunulan araştırmada olduğu şekilde HCV enfeksiyonlarında tedavi yanıt gruplarına göre hem CCR5 hem de CXCR3 ekspresyonlarını birlikte aynı hasta grubunda araştıran çalışmaya rastlanmamıştır.

Kemokin reseptörlerinin yanı sıra kemokin ligandlarının da HCV enfeksiyonlarının patojenezindeki ve tedavi yanıtındaki rolü araştırılmaktadır. Sunulan araştırmada, hasta gruplarında 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 ark.'nın⁽¹³⁾ çalışmasıyla CCL3, CCL4 ve CCL5 için uyumlu iken, Zeremski ve ark.'nın⁽¹⁴⁾ çalışmasıyla 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'ün HCV enfeksiyonlarının patojenezinde rolü olduğu düşünülebilir. CXCR3 ile ilişkili kemokin ligandları açısından bakıldığında Apolinario ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ çalışmasında olduğu gibi, sunulan çalışmada da CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri hasta gruplarında kontrole göre yüksektir. Sunulan araştırmaya benzer şekilde Zeremski ve ark.⁽¹⁶⁾ da CXCR3 ile ilişkili kemokinlerin hepatik ekspresyonlarını HCV enfeksiyonu bulunan hastalarda sağlıklı kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Sunulan araştırma CXCR3 ile ilişkili ligandlar olan CXCL9 ve CXCL10 kemokinlerinin HCV enfeksiyonundaki rolünü desteklemektedir.

Sunulan çalışmada serum CCL3, CXCL9 ve CXCL 10 düzeyleri hasta grupları arasında kar-

şılaştırıldığında CCL3 ve CXCL9 için yanıtlı ve yanıtız hastalar arasında fark bulunmazken, serum CXCL10 düzeyleri yanıtız hasta grubunda yanıtlı hasta grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. CCL3 için bu araştırmada elde edilen sonuçlar Florholmen ve ark.'nın⁽¹³⁾ yaptığı çalışma ile uyumludur. CXCL10 için bu araştırmanın sonuçları Apolinario ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ çalışması ile benzerdir. Apolinario ve ark.⁽¹⁵⁾ yanıtız hastalarda bazal CXCL10 düzeyini yanıtlı hastalara göre yüksek bulmuşlardır ve tedavi sonrasında yanıtlı hastalarda düzeyler anlamlı olarak düşmüştür. Sunulan çalışmada ise ağırlıklı olarak tedavi sırasındaki düzeyler ölçülerek yanıtız hastalarda yanıtlı hastalara göre CXCL10 düzeyleri yüksek bulunmuştur. Sunulan çalışmada bulduğumuz CXCL10 düzeyleri ve tedavi yanıtı arasındaki ilişki benzer şekilde Lagging ve ark.⁽¹⁷⁾, Romero ve ark.⁽¹⁸⁾ ve Fattovich ve ark.'nın⁽¹⁹⁾ yaptıkları çalışmalarda da vardır.

Sunulan alışmada, 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 alınamazken, 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 benzer şekilde, Türkiye'nin batı bölgelerinde yapılan çalışmalarda, HCV genotip 1b %90'ın üzerinde tespit edilmiştir⁽²⁰⁻²²⁾.

Sunulan alışmada, CCR5 delta-32 delesyonunun saptanması için yapılan real-time PCR sonucunda tüm hasta ve kontrol örnekleri "wild type" olarak tespit edildiği için tedavi yanıtı ile CCR5 delta-32 delesyon varlığı arasındaki ilişki incelenememiştir.

Bu çalışmanın bulgularına göre kronik HCV enfeksiyonunda periferik kan CD8+ hücrelerin CCR5 ve CXCR3 yüzey ekspresyonu artmıştır

ancak tedaviye yanıtı ve yanıtı olmayan hasta grupları arasında fark yoktur. Serum CCL3, CXCL9 ve CXCL10 düzeyleri HCV enfeksiyonunda artmıştır, ancak yalnızca CXCL10 düzeyleri pegile interferon-ribavirin kombinasyon tedavisi alan yanıtı olmayan hastalarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. CXCL10 düzeylerinin ölçümü pegile interferon-ribavirin kombinasyon tedavisi alan kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda tedavi yanıtını tahmin etmede kullanılabilir. CXCL10 düzeyleri ölçümü ELISA yöntemi ile yapıldığı için hem göreceli olarak hızlı ve ucuzdur, hem de otomatize sistemlere uyarlanması kolaydır.

Bu çalışmanın iki temel kısıtlılığı bulunmaktadır. Birincisi, kan örneklerinin tümü tedavinin başladığı gün alınmamıştır. İkincisi, bu çalışmadan elde edilen veriler tüm HCV genotipleri ve farklı tedavi rejimleri için genelleştirilemez. CXCL10 düzeylerinin tedavi yanıtını tahmin etmedeki rolünün tam olarak ortaya konabilmesi için farklı HCV genotiplerini ve farklı tedavi rejimlerini içeren hasta gruplarında araştırmaların yapılmasına gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine* 2007; 39:50-62. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.05.013>
2. Ahlenstiel G, Berg T, Woitas RP, et al. Effects of the CCR5-Δ32 mutation on antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 39:245-52. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00193-4)
3. 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; 167:887-99. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62060-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62060-3)
4. 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; 163:6236-43.
5. Willberg C, Barnes E, Klenerman P. HCV immunology-death and the maiden T cell. *Cell Death Differ* 2003; 10(Suppl 1):S39-47. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401122>
6. Larrubia JR, Benito-Martínez S, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parra-Cid T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2008; 14:7149-59. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.7149>
7. Korean Association for the Study of the Liver (KASL). KASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C. *Clin Mol Hepatol* 2016; 22:76-139. <https://doi.org/10.3350/cmh.2016.22.1.76>
8. Zeremski M, Petrovic LM, Talal AH. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007; 14:675-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2006.00838.x>
9. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004; 12:96-102. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.12.005>
10. Tai AW, Chung RT. Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J Hepatol* 2009; 50:412-20. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.11.010>
11. Perney P, Turriere C, Portalès P, et al. CXCR3 expression on peripheral CD4+ T cells as a predictive marker of response to treatment in chronic hepatitis C. *Clin Immunol* 2009; 132:55-62. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.03.521>
12. Larrubia JR, Calvino M, Benito S, 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; 47:632-41. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.04.009>
13. Florholmen J, Kristiansen MG, Steigen SE, et al. A rapid chemokine response of macrophage inflammatory protein (MIP)-1α, MIP-1β 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; 17:204-9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03206.x>
14. Zeremski M, Hooker G, Shu MA, et al. Induction of CXCR3- and CCR5-associated chemokines during acute hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011; 55:545-53. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.12.033>
15. Apolinario A, Diago M, Lo Lacono O, et al. Increased circulating and intrahepatic T-cell-specific chemokines in chronic hepatitis C: relationship with the type of virological response to peginterferon plus ribavirin combination therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19:551-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.01872.x>
16. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, et al. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008; 48:1440-50. <https://doi.org/10.1002/hep.22500>
17. Lagging M, Romero AI, Westin J, et al. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology* 2006; 44:1617-25. <https://doi.org/10.1002/hep.21407>
18. Romero AI, Lagging M, Westin J, et al. Interferon (IFN)-γ-inducible protein-10: association with

histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN- α 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2006; 194:895-903.

<https://doi.org/10.1086/507307>

- 19. Fattovich G, Covolo L, Bibert S, et al.** IL28B polymorphisms, IP-10 and viral load predict virological response to therapy in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33:1162-72.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04635.x>
- 20. Altuglu I, Soyler I, Ozacar T, Erensoy S.** Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. *Int J Infect Dis*

2008; 12:239-44.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2007.07.003>

- 21. Kabakçı Alagoz G, Karataylı SC, Karataylı E, et al.** Hepatitis C virus genotype distribution in Turkey remains unchanged after a decade: performance of phylogenetic analysis of the NS5B, E1, and 5'UTR regions in genotyping efficiency. *Turk J Gastroenterol* 2014; 25:405-10.
<https://doi.org/10.5152/tjg.2014.7083>
- 22. Sunbul M, Khan A, Kurbanov F, et al.** Tracing the spread of hepatitis c virus in Turkey: A phylogenetic analysis. *Intervirology* 2013; 56:201-5.
<https://doi.org/10.1159/000346775>