

**T. C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
DAHİLİ TIP BİLİMLERİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KRONİK HEPATİT B İNFEKSİYONUNDA P21 PROTEİNİNİN  
HEPATOSİT PROLİFERASYONU, HEPATİT B VİRÜS  
REPLİKASYONU VE HEPATİT AKTİVİTESİ İLE İLİŞKİSİNİN  
SAPTANMASI**

**118564**

118564

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. MURAT VARLI**

**TEZ DANIŞMANI**

**DOÇ. DR. HAKAN BOZKAYA**

**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
BOKÜ MANTASYON MERKEZİ**

**ANKARA 2002**

## TEŐEKKÜR

YetiŐmemde büyük emekleri geçen İç Hastalıkları Anabilim Dalı BaŐkanı Sayın Prof. Dr. Gürbüz ERDOĞAN başta olmak üzere, tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalının değerli ğretim yeleri hocalarıma teŐekkürü bir borç bilirim.

Tez konumun seçimi , çalışmaların yürütülmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve hemen her aŐamada yardımlarını ve deneyimlerini hiç esirgemeyen saygı değer hocalarım Sayın Doç. Dr. Hakan BOZKAYA ve Sayın Doç.Dr. Esra ERDEN'e , biyopsilerin boyanması ve değerlendirilmesi sırasında yardımlarını aldığım Sayın Uzm.Dr. Aylin Okçu HEPER ve Uzm. Dr. Ebru SERİNSÖZ'e, tüm patoloji, immnpatoloji ve gastroenteroloji kliniğinin çalıŐanlarına ve her zaman desteğini hissettiğim eŐime en içten sevgilerimi ve teŐekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

Dr. Murat Varlı

## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	:	1 - 3
2. GENEL BİLGİLER .....	:	4 - 11
3. HASTALAR VE METODLAR .....	:	12 - 15
4. BULGULAR .....	:	16 - 20
5. TARTIŞMA .....	:	21 - 26
6. ÖZET .....	:	27 - 29
7. KAYNAKLAR .....	:	30 - 34

## GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit B infeksiyonu halen, ülkemizde ve tüm dünyada, kronik hepatit, fulminan hepatit, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinoma yol açarak, gerek morbidite ve mortalite, gerekse ekonomik yönden önemli bir toplumsal sorun ve sağlık problemi olmaya devam etmektedir.

Hepatit B virüsünün genomik yapısı, fonksiyonu ve replikasyonu ile ilişkili önemli bilgi birikimine rağmen, Hepatit B virüsünün (HBV) neden olduğu karaciğer hasarının mekanizmaları ve niçin virusun bir grup hastada akut ve kendini sınırlayan bir hepatit yaparken, bir diğer grup hastada kronik infeksiyona yol açtığı (viral persistans) tam olarak anlaşılamamıştır.(1) HBV nonsitopatik bir virüsdür ve karaciğer hasarının infekte hepatosite yönelik T hücre yanıtları ile ortaya çıktığına inanılır. Aktif viral replikasyon sonucu artan viral proteinlerin, sitotoksik T lenfositlerine sunulması ile birlikte HBV'ye karşı olan immün yanıtla hepatosit hasarı başlar. Söz konusu hasara yanıt olarak sağlam hepatositlerde kompensatuar proliferasyon-rejenerasyon yeteneği ile hepatosit kitlesi yeterli düzeyde tutulmaya çalışılır. (2,3)

Hangi etiyolojik sebeble olursa olsun, bir karaciğer hasarında azalan hepatosit kitesini telafi etme ve hepatik fonksiyonları sürdürmede, hepatosit proliferasyonu-rejenerasyonu önemli yer alır. Azalmış hepatosit proliferasyonu, genellikle kötü prognostik göstergedir. Hepatosit proliferasyonu, kronik hücre hasarına bağlı hepatosit kaybını ve buna bağlı gelişen fonksiyon kaybını dengelemek için çalışan bir dinamo gibidir. (4) Karaciğer rejenerasyonunun moleküler düzenlenmesi konusunda detaylı bir bilgi birikimi ortaya çıkmıştır. Hepatositler, normal koşullarda oldukça düşük proliferasyon özelliğine sahip yavaş çoğalan hücrelerdir. (5) Doku kaybı (parsiyel hepatektomi) veya hepatosit hasarı ( viral, toksinler, iskemi )

sonucunda, hücre siklusunun Go fazında sessiz olarak bulunan hepatositler, potansiyel olarak bulunan rejenerasyon yeteneklerini hücre siklusuna girerek kazanırlar. Kalan hepatositlerin kompensatuar hiperplazisi sonucu, doku hasarının olumsuz etkileri düzeltilir. Bu rejeneratif süreç, hücre siklusunu kontrol eden stimülatör ve inhibitör faktörlerin kompleks etkileşimi ve çeşitli feed-back mekanizmalar ile düzenlenir. (3)

Hücre proliferasyonunun kontrolünde, hücre siklusunda majör rol alan siklin ve siklin bağımlı kinazlardan oluşan protein kinaz komplekslerinin aktivasyonu veya inhibisyonunu sağlayan çeşitli düzenleyici moleküller önemli roller alırlar. Bunlar hücre siklüsünün farklı fazlarına etki ederler. Bu düzenleyiciler içinde P21 proteini majör rol alan bir moleküldür ve bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CDKi) olarak hücre siklusunu negatif yönde kontrol ederek hücre siklüsünün ilerlemesini önler. Bunu, hücre siklüsünün G1—S fazı geçişini bloke ederek yapar. Sadece siklin bağımlı kinaz kompleksini değil, aynı zamanda DNA polimerazı da inhibe ederek DNA sentezini önler. Karaciğer rejenerasyon modellerinde yapılan çalışmalarda hepatosit hücre siklüsüne olan etkileri gösterilmiştir. Kronik karaciğer hastalıklarında hepatosit hücre siklüsündeki düzenleyici mekanizmalar tam anlaşılammış olmakla birlikte, P21 proteininin karaciğerde hepatositlerde eksprese olduğu gösterilmiş ve böylece hepatosit proliferasyonunda düzenleyici olarak rol alabileceği düşünülmüştür (6,7,8)

Yeni çalışmalar, hepatosit hücre siklüsünün, Hepatit B virüsü replikasyonunu da etkileyebileceğini göstermektedir. Böylece karaciğer hasarını takiben ortaya

ıkan hepatosit proliferasyonu, bir yandan kompensatuar bir yanıt olarak karaciğer kitlesini korumaya çalışırken, öte taraftan hepatit B virus replikasyonuna da etki ederek, hastalığın gidişinde belirleyici olacaktır. Bu nedenle karaciğer hücrelerinde hepatosit replikasyonunu kontrol eden mekanizmaların ortaya konması, hepatit B virusu infeksiyonunda doku hasarı ve virus eliminasyonuna yol açan süreçleri anlamamıza yardımcı olacaktır.

Yukarıda açıklanan gerekçelerle çalışmamızda; hücre siklusunu kontrol eden P21 proteininin ekspresyonunun, hepatosit proliferasyonu, HBV replikasyonu ve hepatit aktivitesi ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



# GENEL BİLGİLER

## Hepatit B virüs infeksiyonu ve karaciğer hasar mekanizmaları

HBV, «Hepadnaviridae» ailesinden hepatotrofik bir DNA virüsüdür. Virüs partikülü 3200 baz çiftinden oluşan dairesel, kısmen çift sarmallı bir DNA molekülü içerir. HBV genomu üzerinde 4 adet protein kodlayabilecek açık okuma alanı (ORF) vardır ve bunlar birden fazla proteini kodlama özelliğinde olup S, C, X ve P proteinlerinin sentezine yol açarlar. Virion olarak bilinen 42 nm çaplı Dane partikülü, Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg), Hepatit B kor antijeni (HBcAg) ve Hepatit B e antijeni (HBeAg) olmak üzere üç farklı yapıda antijen içerir. HBsAg, virüsün kılıfı olarak bilinen 7 nm'lik lipoprotein tabakada bulunur. HbcAg, nükleokapsid denilen yapıyı oluşturan çekirdek kısmında (kor partikülünde) bulunurken HbeAg, esas olarak dolaşıma sekrete olan bir proteindir. Çekirdek kısmında bu antijenlerin yanında DNA ve DNA polimeraz enzimi bulunur. DNA polimeraz enzimi virüs replikasyonu sırasında eksik olan tek DNA sarmalını tamamlayarak dairesel kapalı çift sarmallı DNA'yı oluşturur.

Viral zarfta bulunan kompleks yapılı HBsAg, "small" (S), "middle" (M) ve "large" (L) olmak üzere 3 polipeptidden oluşur. Majör protein olarak adlandırılan S polipeptidi en yoğun oranda HBsAg'yi oluşturan komponent olup, S geni tarafından kodlanır. M proteini S geninin Pre-S2 ve S kısımlarını içerir. L proteini ise Pre-S1, Pre-S2 ve S kısımlarını içine alır. Pre-S1 ve Pre-S2, virüsün hepatosite bağlanmasında rol oynarlar. Bunlara karşı gelişen antikorlar korumada etkin bir rol oynamaktadır.

C geninde bulunan "precore" bölgesi HBeAg sentezi ve salınımından sorumludur. HBeAg sentezlendiği hücrelerden serbest hale geçip, dolaşıma katılır. HBeAg'nin serumda bulunması aktif virüs replikasyonunu ve infektiviteyi gösterir. HBeAg/antiHBe serokonversiyonu oluşması olguların çoğunluğunda viral

replikasyonun bittiğini gösterir. Ancak AntiHBe olduğu halde HBV DNA ölçülebilir düzeyde olan ve aktif karaciğer hastalığı süregiden hastalar da vardır. Bu durumdan virüsün precore bölgesinde meydana gelen bir mutasyon sorumludur. Mutasyon sonucu stop kodon oluşur ve bu durumda HBeAg sentezlenemez.

X geni ürünü olan X proteini, karaciğerde bulunan ve replikasyonda ve apoptotik hücre ölümünde rol oynayan bir antijendir. Hepatoselüler kanser gelişimi ile ilişkili olduğunu düşündüren bulgular vardır.

P geni de, S geni gibi virüsün en büyük ve majör genlerinden birisidir. DNA polimeraz enzimini kodlar.

Kronik Hepatit B infeksiyonunun seyri süresince serum ve karaciğer hücresi yüzeyinde viral antijenler gösterilebilmektedir. Ortaya çıkış biçimleri infekte hepatositlerdeki virüsün biyolojik davranışı ile ilişkilidirler. Viral replikatif fazda HBsAg ve HBeAg serumda bulunurken, hepatositlerde HBsAg ve HBcAg açığa çıkmaktadır. Replikasyonda sentezlenen bu antijenlere karşı sırasıyla antiHBs, Anti Hbe ve Anti HBc antikoları oluşur. Serumda HBV DNA'nın varlığı viral replikasyonun en hassas göstergesidir (9-14)

Kronik Hepatit B virüs infeksiyonunda karaciğer hücre hasarının immün sistem aracılıklı olduğu kabul edilmektedir. Güçlü, poliklonal, multispesifik sitotoksik T lenfosit yanıtları, akut HBV infeksiyonunda, virüsün eliminasyonunda önemli rol oynarlar. Infekte hepatositlerin yüzeyinde eksprese edilen HBcAg'ye karşı oluşan HLA class I aracılı sitotoksik T lenfosit yanıtı, hepatoselüler harabiyetin yanısıra virus eliminasyonundan da sorumludur. Akut hepatitle kıyaslandığında kronik B hepatitinde sitotoksik T lenfosit cevabı zayıftır veya yoktur. Virüsün, hepatosit hasarı olmaksızın (nonsitolitik şekilde) elimine edildiği, sitokin aracılıklı viral replikasyon inhibisyonunu içeren mekanizmalar da söz konusudur. (15)

Kronik ve replikatif HBV infeksiyonu süresince karaciğerdeki inflamatuvar aktivitenin derecesi değişkendir. Karaciğer hasarının derecesini HBV ve konağın

immün cevabı arasındaki ilişki belirler. İmmüntoleran faz, aktif viral replikasyona rağmen karaciğer hasarının minimal olduğu dönemdir. Aktif hepatosit hasarının olduğu ve viral replikasyonun rölatif olarak daha düşük seviyelerde olduğu immün temizlenme (immünlirens fazı) dönemi, virus tam olarak elimine edilemedi ise tekrarlayacak ve karaciğer hasarı atakları olarak kendisini gösterecektir. Tekrarlayan bu immün eliminasyon atakları sonucu, histolojik olarak siroz ve hepatoselüler karsinoma kadar ulaşan karaciğer hastalığı ortaya çıkarken, giderek virus nonreplikatif bir faza ulaşacaktır. (16,17)

### **Hepatosit proliferasyonu**

Hepatositlerin rejenerasyonunda multipl basamaklar yer alır. Birbiriyle etkileşen inhibitör ve stimülatör faktörlerin karmaşık bir ağı ve etkileşimi sonucu rejeneratif işlem düzenlenir. Normal hepatositlerin çoğunluğu yetişkinlerde oldukça iyi farklılaşmış ve istirahat durumundadır. Çoğunluğu hücre siklusünün Go fazındadır ve çok yavaş çoğalırlar. Karaciğer rejenerasyon yeteneğini gösteren en iyi çalışma modeli olarak kemiricilerdeki %70 parsiyel hepatektomi (PH) modeli bilinir. Hepatosit DNA sentezi hepatic kitle kaybının belirli bir eşik değere ulaşması ile başlar. Erişkin sıçanlarda bu süreç karaciğer kitlesinin %30'dan azı kaldığında başlar. PH sonrası ilk 24-36 saatte hücre siklusünün ilerlemesi ve hepatosit proliferasyonu ile hepatosit sayısında önemli artışlar olur. 7-10 gün içerisinde karaciğer kitlesinin onarımı tamamlanır. Bu model hücre siklusü ile onu kontrol eden genlerin (Siklin ve CDK genleri) düzenlenmesini invivo olarak göstermek için yaygın şekilde kullanılmaktadır. İnsanlarda majör hepatektomiye takiben tam rejenerasyon 3-6 ay sürer. (18,19) Doku kaybı veya hepatosit hasarını takiben istirahat fazından (Go) hücre siklusüne geçiş başlar. Prereplikatif G1 fazı, DNA sentezinin olduğu S fazı, bu fazı da mitozun olduğu M fazı izler. Mitoz fazı sonrası hücre bölünmesi tamamlanmış olur. Çeşitli hepatotrofik faktörler (TNFalpha, IL-6, TGFalpha, HGF) hücre siklusünün değişik basamaklarında uyarıcı etki yaparak hepatosit

proliferasyonunu artırır. Bu hepatotrofik faktörlerin bazılarının ekstrahepatik orijinli olması ve karaciğere portal ven yoluyla ulaşması ilginçtir.(3)

İnsan dokularında proliferen olan hücreleri göstermek için Ki 67, DNA polimeraz alfa, PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) gibi çeşitli proliferasyon göstergeleri en yaygın kullanılan işaretleyicilerdir. Bunlar, aynı zamanda çeşitli tümörlerin malign potansiyellerinin değerlendirilmesi için de kullanılmışlardır. Bunlar içinde PCNA/siklin intranükleer 36Kda moleköl ağırlığında bir polipeptittir. Sentezi hücre proliferasyonu ile ilişkilidir ve DNA polimeraz deltanın yardımcı bir proteindir. Hem normal, hem de transformasyona uğramış proliferen hücrelerde bulunurlar. Proliferen olan hücrelerde geç G1-S fazı geçişinde sentezi önemli ölçüde artış gösterir ve hücre proliferasyonunun iyi bir işaretleyicisidir. PCNA ekspresyon artışı DNA sentezi başlamadan hemen önce geç G1 fazı sırasında nükleusda görülür ve S fazı sırasında maksimuma ulaşırken G2 ve M fazında tekrar azalır.

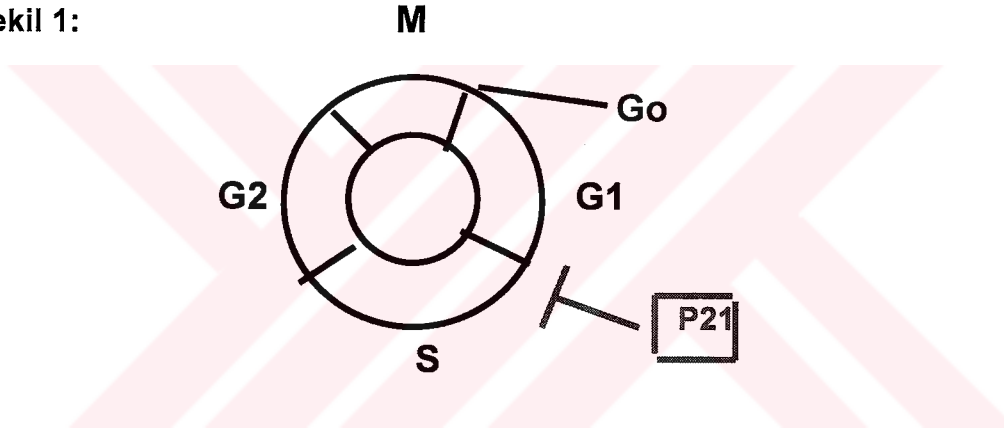
PCNA aktivitesi, gerek çeşitli tümör dokularında, gerekse tümör dışı dokularda PCNA'ya karşı kullanılan antikorlarla immunhistokimyasal yolla tespit edilebilmektedir. PCNA aktivitesi hücre proliferasyonu olan herhangi bir yerde görülebilir. Karaciğer dokusunda da immunhistokimyasal olarak gösterilen PCNA, hepatosit proliferasyonunun güvenli bir işaretleyicisi olarak kabul edilmektedir.(20-27)

## Hücre siklüsü ve P21'in hücre siklusundaki rolü

Rejenerasyonda hücrelerin çoğalması hücre siklüsü denilen ve birbirini izleyen evrelerin oluşturduğu bir dizi olayların sonucu olarak gerçekleşmektedir. Hücre siklüsü ile ilişkilerine göre deri gibi sürekli prolifere olan, nöron gibi prolifere olmayan, ileri farklılaşma gösteren hücreler ve normalde bu siklüsün dışında kalan, ancak uyarılar etkisiyle proliferasyon aşamasına giren karaciğer hücrelerinin oluşturduğu üç farklı hücre grubu tanımlanabilir.

Hücrelerin benzer iki hücreye bölünmesi dört aşamadan oluşur. Bunlar üç basamaklı mitoz hazırlık-interfaz evresidir (G1- S- G2 fazları) ve bu fazı izleyen son basamak mitoz (M) fazıdır. (Şekil 1)

Şekil 1:



Hücre döngüsündeki bu dört aşamadan ikisi fonksiyonel, diğer ikisi hazırlık aşamasıdır. Fonksiyonel fazlar sentez (S) ve M fazlarıdır. Hücre kendisini S fazına G1, M fazına ise G2 aşaması ile hazırlar. Aktif olarak bölünmeyen hücreler terminal farklılaşma ile bu siklik aşamalardan kalıcı olarak çıkmışlardır veya dinlenme evresi olarak bilinen Go evresinde bulunurlar. Go evresindeki hücreler normalde bölünmeyip, ancak uygun uyarılarla tetiklenirler. Bu evreleri sırasıyla inceleyecek olursak;

**Go fazı:** Vücuttaki hücrelerin büyük çoğunluğunun bulunduğu latent yada dinlenme evresi olarak isimlendirilen evredir. Uygun uyarılar olduğunda G1

evresine geçerek hücreler siklüse katılırlar. Karaciğer ve kemik iliği hücreleri Go fazında bulunurlar. Nöronlar ise terminal olarak farklılaşmışlardır, bu yüzden canlılığın yaşamı süresince hücre siklüsüne katılmazlar ve sürekli Go fazında bulunurlar.

**G1 fazı:** Hücre siklüsünün en uzun evresidir. Süresi hücre tipine, hücrenin organizmadaki rolüne ve çevresel koşullara göre farklılık gösterebilir. Bu fazda RNA ve protein sentezi yapılır.

**S fazı:** DNA sentezi bu fazda başlatılır. RNA ve protein sentezi de devam eder. Yaklaşık 6 saat devam eder.

**G2 fazı:** DNA sentezi durmuştur. RNA ve protein sentezi devam eder. Bu faz hücreyi mitoz fazına geçişe hazırlayan son hazırlık fazıdır.

**M fazı:** Mitoz bölünmenin olduğu fazdır. Sentez fazında 2 katına çıkmış olan genetik materyel (DNA) iki yavru hücreye paylaşılır. Bu fazın sonunda aynı genetik bilgiye sahip iki hücre oluşur. (7,28)

Hücre siklüsü, siklin, siklin bağımlı kinaz (CDK) ve çeşitli regülatuar proteinler aracılığı ile düzenlenir. Siklinler, hücre siklüsünün sistematik biçimde işlevini sürdürmesini sağlayan proteinlerdir ve siklin sentezi hücrenin proliferatif durumu ile korelasyon gösterir. DNA sentezi öncesinde uyarılmaya başlarlar ve artış gösterirler. PCNA ve siklinlerin pekçok özellikleri benzerlik gösterirler. (20) Siklin ve CDK komplekslerinin birbiriyle koordine bir şekilde aktive olması, normal hücre siklüsünün ilerlemesini düzenler. Bu komplekslerin regülasyonundaki bozukluklar malign farklılaşma ile ilişkilidir. (29) Hücre siklüsünde farklı siklin ve CDK kompleksleri, hücre siklüsünün farklı fazlarını regüle ederler. Dolayısıyla her faz için farklı siklin subüniti gereklidir. Etkili oldukları evrelere göre G1 ve mitotik siklinler olarak adlandırılırlar. G1 siklinler siklin C, D ve E'dir. Mitotik siklinler ise siklin A ve

B'dir. G1 siklinler G1-S fazı geçişinde görev alırken, Mitotik siklinler G2-M fazında rol oynarlar. (28)

Siklin D1/ CDK4 kompleksi G1 fazı, siklin E/CDK2 kompleksi G1-S fazı, siklin A/ CDK2 S fazı, Siklin B/ CDK1 kompleksi M fazı ile ilişkilidirler. (19) Siklin ve CDK etkileşimi sonucunda aktive olan protein kinaz kompleksleri, hücre siklüsünün spesifik fazlarına doğru ilerlemeyi başlatır. Örneğin D tipi siklinler (D1,D2,D3) CDK4 ile ilişkilidir ve G1 faz ilerlemesini düzenlerler. (18)

CDK kompleksleri, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri olarak isimlendirilen (CDKi) çeşitli inhibitör subunitlerine bağlanarak inhibe edilirler. CDKi'lar hücre siklüsü ve regülasyonunda uygun zamanda aktive olarak fonksiyon görürler ve DNA hasarı, radyasyon, nütrisyonel eksiklik, TGF $\beta$  gibi antimitojenik faktörleri içeren çok geniş uyarılara cevap olarak, CDK aktivitesini kontrol ederek hücre siklüsünün ilerlemesini düzenlerler. (7,30) CDKi'lar iki alt sınıfa ayrılırlar. Her bir sınıf üyesinin inhibisyon hedefleri farklıdır. INK 4 sınıf üyeleri P15, P16, P18 ve P19 spesifik olarak CDK4 ve CDK 6'yı inhibe eder. Diğer sınıf olan CIP/KIP protein ailesi P21cip, P27 kip ve P57 kip2' den oluşur. CIP/KIP ailesi INK4'den daha geniş bir kinaz grubunu bağlar ve inhibe eder. (8) Bu ailede en iyi P21 tanımlanmıştır. P21 proteini, P21 genince (Waf1/Cip1) kodlanır ve bu gen 6.kromozomda (6p 21.2) lokalizedir. P21, posttranskripsiyonel olarak çeşitli antiproliferatif faktörlere cevap olarak artar. Örneğin radyasyon, oksidatif stres, etanol, antineoplastik ajanlara bağlı büyüme inhibisyonu ile ilişkilidir. P21 sentezi, esas olarak p53 tarafından indüklenir. P21 promotörü, P53 bağlayan bölgeler içerir ve P21 proteini P53'ün uyardığı hücre siklüsü duraklamasında ve apoptozunda anahtar mediatördür. P21, P53 den bağımsız yollarla da regüle edilir. P21 gen ekspresyonunu kontrol eden diğer transkripsiyonel faktörler AP2, myoD, C/EBP alfa, VitD3 reseptörü, STAT1'dir. P21 sadece CDK aktivitesini değil, aynı zamanda DNA polimerazı da inhibe ederek Proliferating cell nuclear antigen'e (PCNA) bağlı DNA sentezini direkt olarak bloke

eder. İnvivo ve invitro olarak malign hücre büyümesini baskıladıkları görülmüştür. Bu gözlemler P21'in tümör supresör protein gibi fonksiyon gördüğünü düşündürmektedir. Karaciğer hasarı ve hasara cevaben rejenerasyon modeli olan CCl4 (karbon tetraklorür) intoksikasyonu modelinde veya parsiyel hepatektomi modelinde, kompensatuvar hepatosit replikasyonu süresince P21'in, P53 bağımsız yolla da « upregüle » olduğu gösterilmiştir. (4,31-33)



**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

## HASTALAR VE METODLAR

Bu çalışmaya Ocak 1997 ile Mart 2001 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (AÜTF) Gastroenteroloji kliniği ve polikliniğine başvuran, yaşları 15 ile 62 arasında değişen ve histolojik olarak doğrulanmış 66 kronik hepatit B hastası alındı.

Bu hastalar aşağıda belirtilen özelliklere göre 3 gruba ayrıldı

- 1. grup (HbeAg(+), aktif hastalığı olanlar:** HBeAg(+), ALT değeri yüksek (>normal x1.5 kat ), yüksek HBV DNA (>5 pg/ml) olan 27 hasta ( %40.9 )
- 2. grup (HbeAg(-), aktif hastalığı olanlar:** HBeAg(-), ALT değeri yüksek (>normal x1.5 kat ), yüksek HBV DNA (>5 pg/ml) olan 22 hasta ( %33.3 )
- 3. grup (HbeAg(-), hepatit B virüs taşıyıcısı olanlar:** HBeAg (-), ALT değeri normal , hibridizasyonla ölçülemez HBV DNA (< 5 pg/ml) olan 17 hasta (%25.8) bulunuyordu. Sözü edilen parametreler ve grupların yaş-cinsiyet dağılımı tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1:** Hasta gruplarının dağılımı ve özellikleri

	Hasta sayısı		HbeAg	AntiHBe	ALT (U/L)	HBV DNA (pg/ml)	Yaş	Cinsiyet	
		%						E	K
up	27	40.9	(+)	(-)	>Nx1.5	>5	30±12	22	5
up	22	33.3	(-)	(+)	>Nx1.5	>5	42±8	13	9
up	17	25.8	(-)	(+)	N	<5	37±11	4	13

**N: Normal**

Hasta seçiminde yaş ve cinsiyet sınırlaması gözetilmedi. 40 g/hafta üzerinde alkol tüketim öyküsü olanlar, diğer viral ve nonviral etiyolojili kronik hepatitler çalışmaya alınmadı. Tüm hastalar retrospektif olarak herhangi bir antiviral tedavi başlanmadan önceki ALT ve HBV DNA değerleri gözönüne alınarak değerlendirildi ve karaciğer biyopsisi mevcut olan hastalar çalışmaya alındı.

**Hepatit serolojisi ve HBV DNA ölçümü:** HBsAg, AntiHBs, HBeAg, AntiHBe, Anti HDV antikörlerinin serumda tespiti için, Abbott AxSYM sistemde, 3. jenerasyon

mikropartikül enzim immunoassay (MEIA) yöntemi kullanıldı. ( Abbott Laboratories, USA)

HBV DNA ölçümü , Digene Hybrid capture systemde liquid hybridization assay yöntemi ile serumda kantitatif olarak tespit edildi. Ölçülebilen sınırı 5 pg/ml idi.

**Karaciğer biyopsi materyellerinin değerlendirilmesi:** Karaciğer biyopsi materyellerinin tamamı AÜTF Patoloji ABD' dan aynı patolog tarafından değerlendirildi. İğne biyopsisi tekniği ile alınan tüm biyopsi materyellerinin 24-48 saat süreyle %10'luk formalin solüsyonunda tespit edilmesi sonrası parafine gömülmüş olan örnekleri elde edildi.

**Histopatolojik değerlendirme:** Olguların histolojik aktivite indeksleri (HAİ) ve fibrozis evrelendirmeleri hematoksilin eozin ve Van Giesson Trikrom kesitlerde değerlendirilmiştir. Histopatolojik bulguların değerlendirilmesinde Knodell ve ark. tarafından önerilen, sayısal olarak skora yapılan histolojik aktivite indeksi (HAİ) kullanıldı ve nekroinflamatuvar aktivite ve fibrozis evresi bu sisteme göre değerlendirildi. Skora yapılırken periportal köprüleşme nekrozu, intralobüler dejenerasyon ve fokal nekroz, portal inflamasyon ve fibrosis değerlendirildi ve bu özelliklere göre elde edilen skorlar toplanarak HAİ skoru elde edildi. HAİ skoru  $\leq 8$  olan olgular hafif aktivite gösteren, HAİ skoru  $>8$  olanlar ise belirgin aktivite gösteren olarak değerlendirildi.

**P21 ve PCNA'nın immünohistokimyasal metodla değerlendirilmesi:** Biyopsi materyellerin parafin bloklarından immünohistokimyasal boyamalar için 4-6  $\mu\text{m}$ 'lik kesitler " poly-L-lysin" (Sigma) ile kaplanmış lamlara alındı.

İmmünohistokimyasal inceleme için p21( WAF1/Cip1/Sdi1/Pic1/ Neomarkers) ve Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) / Clone PC10 / Neomarkers) ticari kiti kullanılarak streptavidin-biyotin-peroksidaz yöntemi ile aşağıdaki basamaklar gerçekleştirilmiştir.

- 1.) Deparafinizasyon ve rehidratasyon sonrasında,
- 2.) Kesitlere " antigen retrieval" işlemi uygulanmıştır. Bu işlem P21 boyanacak kesitler için kapalı bir kaptaki 1 litrelik sitrat buffer içinde, mikrodalga ile 5'er dakika süre ile 5 seans halinde yüksek enerji (750 W) uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Aynı işlem PCNA boyanacak kesitler için aynı solüsyonda düdüklü tencerede 2 dakika yüksek basınç altında yapılmıştır. Daha sonra bu kesitler oda ısısında 20 dakika soğutulmuş ve 5 dakika distile su ile yıkanmıştır. Diğer boyalarda bu basamak uygulanmıştır.
- 3.) Phosphate buffer saline (PBS) ile 5 dakika yıkama sonrasında,
- 4.) Beş dakika %3'lük hidrojen peroksit uygulanarak endojen peroksidaz aktivitesi ortadan kaldırılmıştır.
- 5.) PBS ile 5 dakika yıkama sonrasında ,
- 6.) Non-immün bir serum olan "Protein blocking solution" 15 dakika uygulanmıştır.
- 7.) Bu işlemden sonra primer antikorlar uygulanmış ve konsantre olan PCNA 1/50 dilüsyonunda, p21 ise kullanıma hazır " ready-to-use" şekilde dilüe edilmeden oda ısısında 3 saat süreyle kesitlere uygulanmıştır.
- 8.) PBS ile 5 dakika yıkama sonrasında ,
- 9.) Sekonder antikor 15 dakika uygulanmıştır.
- 10.) PBS ile 5 dakika yıkama sonrasında,
- 11.) Kesitler streptavidin peroksidaz kompleksi ile 15 dakika bekletilmiştir.
- 12.) PBS ile 5 dakika yıkama sonrasında,
- 13.) Amino-etil-karbazol (AEC) kromojen 5 dakika uygulanmıştır.
- 14.) PBS ile 5 dakika yıkama sonrasında,
- 15.) Zemin boyanması ( counterstaining ) için Mayer's hematoksilen 2 dakika uygulanmıştır.

16.) Bunun hemen ardından, musluk suyu ile yıkanan kesitler " Aqueous mounting medium" ile kapatılmıştır.

P21 antikoru için meme kanseri kesitleri, PCNA antikoru için normal lenf nodülü kesitleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak, pozitif kontrol kesitlerine primer antikor yerine PBS kullanılarak diğer boyama basamakları aynı şekilde uygulanmıştır.

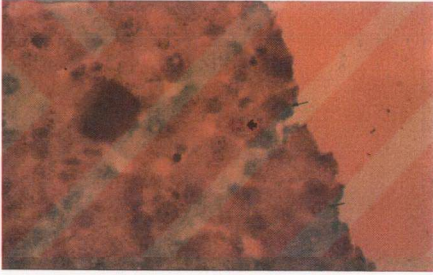
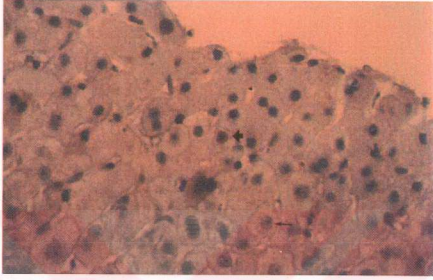
Her iki antikor içinde değerlendirme sırasında immünohistokimyasal boyanmanın yoğunluğuna bakılmaksızın nükleer kırmızı-kahverengi boyanma pozitif olarak kabul edilmiştir.

Değerlendirme, her vakada 1000 hücre sayılarak ve pozitif olan hücrelerin yüzdesi alınarak elde edilen nükleer boyanma indeksi (Labeling index) ile yapıldı.

**İstatistiki değerlendirme:** Çalışmada elde edilen tüm veriler Office 98 SPSS istatistik paket programı ile, niteliklerine göre Mann-Whitney U testi, Kruskal-Wallis testi ve Chi-Square (ki kare) ve Spearman's korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir.  $P < 0.05$  olan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir

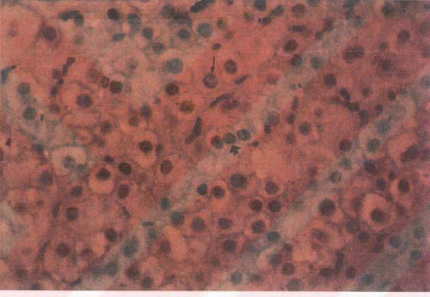
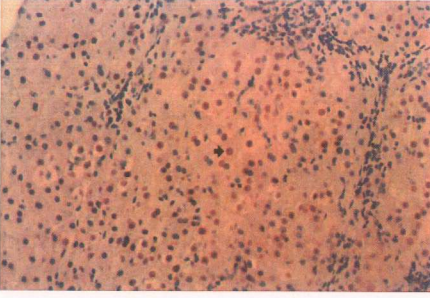
## BULGULAR

Bu çalışmada, materyal metod bölümünde tanımlandığı gibi HbeAg (HbeAg+ ve HbeAg-) durumu, viral replikasyon ve karaciğer hastalığı aktivitesine göre gruplanan toplam 66 kronik hepatit B hastasının karaciğer biyopsi örneklerinde PCNA ve P21 immunhistokimyasal olarak boyanmıştır. P21 antijeni primer olarak hepatosit nükleusunda kırmızı-kahverengi boyanma şeklinde görülmüştür. ( Resim 1,2 ).



**RESİM1-2:**Kırmızı/kahverenkli nükleer p21 pozitifliği (kalın ok), diğer alanlarda p 21 ekspresyonu göstermeyen mavi hepatosit nükleoları (ince ok) x 100

Aynı hastalarda PCNA antijeni de esas olarak hepatosit nükleusunda lokalize olmak üzere kırmızı-kahverengi renkte boyanmıştır. ( Resim 3, 4)



**RESİM3-4:**Kırmızı/kahverenkli nükleer PCNA pozitifliği(kalınok) diğer alanlarda

PCNA ekspresyonu göstermeyen mavi hepatosit nükleoları(ince ok) x 100

Her 3 grup hastada, ALT, HBV DNA ve HAI skoru, önceden tasarlandığı şekliyle farklılıklar gösteriyordu. Burada merak edilen sonuç, bu grupların PCNA ve P21 boyanma indeksleri yönünden ilişkisinin tespit edilmesiydi. Bu değerlendirmelerin sonucunda gruplar arasında PCNA ve P21 labelling index'leri açısından fark bulunamamıştır.

(Her grupta bulunan parametrelerin değerleri tablo 2'da gösterilmiştir.)

**Tablo 2:** Gruplarda yer alan parametrelerin değerleri

	ALT	HBV DNA	PCNA	P21	HAİ
<b>Grup 1</b>	97±60	1481±838	0.163±0.140	0.083±0.130	6.8±3.8
<b>Grup 2</b>	135±132	454±720	0.301±0.240	0.048±0.111	9.4±4.1
<b>Grup 3</b>	16±4	<5	0.277±0.323	0.003±0.006	2±1.1

**P21 boyanma durumuna göre karaciğer hastalığı aktivitesi, hepatosit proliferasyonu ve viral replikasyonun değerlendirilmesi:** alışmaya giren tüm hastalar birarada değerlendirildiğinde P21 boyanma - boyanmama (p21+, p21-) durumuna göre ALT, HBV DNA , PCNA ve HAİ skorları karşılaştırıldığında P21 boyaması olan ve olmayan hasta grupları arasında anlamlı fark grlmedi. (P>0.05) Bu bulgular tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 3:** p21(+) ve p21(-) hastalarla ilişkili parametreler

	Hasta sayısı	ALT IU/ml	HBV DNA pg/ml	PCNA	HAİ
<b>p21 (+)</b>	32 (%48.4)	100±129	781±928	0.219±0.246	6.5±4.2
<b>p21 (-)</b>	34 (%51.6)	79±50	737±924	0.256±0.230	6.4±4.8

P21 boyanan ve boyanmayan hastaların histolojik aktiviteleri gruplanarak (HAİ ≤ 8 (minimal hastalık) ve HAİ >8 (aktif hastalık) karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı.(p>0.05) İlgili değerler tablo 4'de verilmiştir.

**Tablo4:** HAI skoruna göre P21+/- hastaların dağılımı

	HAI≤8	HAI>8
<b>P21(+)</b>	20 (%62.5)	12 (%37.5)
<b>P21(-)</b>	21 (% 61.8)	13 (% 38.2)
<b>Toplam</b>	41 (%62.1)	25 ( %37.9)

Her 3 grup kendi içinde P21 boyanan ve boyanmayan hastaların, ALT, HBV DNA, PCNA ve HAI skorları açısından karşılaştırıldığında P21 boyanan ve boyanmayan olgular farksızdı (  $p>0.05$ ) Bu parametreler ile ilgili değerler tablo 5'de verilmiştir.

**Tablo 5:** Gruplardaki P21+/- hastaların ALT, HBV DNA,PCNA ve HAI değerler

Gruplar	P21+/-	ALT	HBV DNA	PCNA	HAI
<b>Grup 1</b>	P21(+)	114±73	1378±878	0171±0.155	7.5±4.5
	P21(-)	73±23	1631±792	0.150±0.121	5.8±2.8
<b>Grup2</b>	P21(+)	177±235	414±716	0.317±0.263	9.3±4.8
	P21(-)	117±40	473±746	0.293±0.238	9.5±4.0
<b>Grup 3</b>	P21(+)	16.4±5.6	5	0.228±0.354	1.9±0.9
	P21(-)	16±4.4	5	0.331±0.298	2.3±1.5

**Karaciğer hastalığının aktivitesine göre değerlendirme:** Tüm hastalar HAI skoru  $\leq 8$  olan ve HAI skoru  $> 8$  olanlar şeklinde gruplandırılarak ALT, HBV DNA, PCNA ve P21 değerleri açısından değerlendirildi. Düşük ve yüksek hastalık aktivitesine sahip iki grup arasında, yukarıdaki parametreler açısından anlamlı farklılık görülmedi.( $p>0.05$ )

**Tablo 6:** HAI  $\leq 8$  ve HAI  $> 8$  hasta gruplarının ALT, HBV DNA, PCNA (labelling index) ve P21 (labelling index) değerleri

	ALT	HBV DNA	PCNA	P21
HAI $\leq 8$	60 $\pm$ 52	633 $\pm$ 908	0.235 $\pm$ 0.255	0.019 $\pm$ 0.052
HAI $> 8$	136 $\pm$ 130	964 $\pm$ 918	0.243 $\pm$ 0.209	0.103 $\pm$ 0.152

**Korelasyon analizleri:** Tüm hastalar bir arada değerlendirilerek hastaların ALT, HBV DNA, PCNA, P21 ve HAI parametrelerinin birbiriyle korelasyonlarının bulunup bulunmadığı araştırıldığında, ALT, HBV DNA ve HAI skoru, PCNA ve P21 ile korelasyon göstermiyordu.

Korelasyon analizi, her grubun kendi içinde gerçekleştirildiğinde, yalnızca **Grup 1**'de olmak üzere ALT ve P21 değeri arasında korelasyon saptandı ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.44$ ). Diğerleri arasında korelasyon yoktu. **Grup 2**'de ilgili parametreler arasında anlamlı ilişki görölmedi. ( $p > 0.05$ ) **Grup 3**'de de ilgili tüm parametreler arasında anlamlı ilişki saptanmadı. ( $p > 0.05$ )

## TARTIŞMA

Karaciğer rejenerasyonu, virüsler ve toksinler gibi nedenlerle gelişen karaciğer hasarına adaptif cevap olarak ortaya çıkar. Yeni çalışmalar deneysel karaciğer rejenerasyon modellerinde p21'in hepatoselüler hücre siklusunu düzenlediğini göstermiştir. (4) İnsan karaciğerinde P21 proteinin, hepatosellüler kanser dokusunda eksprese olabildiğinin gösterilmesinin yanısıra, bu proteinin yeni olarak tümör dışı hasarlı karaciğerde de eksprese olabildiği ve karaciğer hasarının ciddiyeti ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Bununla beraber bu çalışmalar sınırlı sayıda ve farklı etyolojilere bağlı (hepatit B, hepatit C, alkolik karaciğer hastalığı) olarak kronik karaciğer hastalığı gelişen hastalardan oluşan serileri içermektedir. Ayrıca kronik karaciğer hastalıklarının en sık nedeni olan viral hepatitlerde, viral replikasyon ve P21 proteini ekspresyonu arasında bir ilişki olup olmadığı bu çalışmalarda sınırlanmıştır. Biz bu çalışmada yeterli sayıda hastadan oluşan ve yalnızca kronik hepatit B hastalarını içeren bir seride, P21 ekspresyonunun karaciğer hasarı ve hepatosit proliferasyonu ile ilişkilerinin yanısıra, viral replikasyonla ilişkilerini de sınırlamayı amaçladık.

Bu çalışma sonuçları, önceki bazı çalışmalara zıt olarak, histolojik hasarın derecesi ile P21 protein ekspresyonu arasında bir ilişki ortaya koyamamıştır. Yapılan çalışmalarda, p21 ile artmış inflamasyon ve fibrosizin ilişkisi olduğu ileri sürülmektedir (34, 35) Kronik hepatit C'li hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada p21 ekspresyonunun fibrosiz evresi ve inflamasyon derecesi ile korelasyon gösterdiği bildirildi.(35) Yine hepatit B ve hepatit C'ye bağlı kronik hepatit ve siroz hastalarını içeren bir çalışmada, sirozlu hastalarda, siroz olmayanlara göre her iki virüs tipinde de p21 ekspresyonu daha fazla görülüyordu. Aynı çalışmada siroz olmayan olgular içinde fibrozis evresi yüksek olanlarda p21 ekspresyonu, düşük olanlara kıyasla daha fazla olarak bulundu. Araştırmacılar bu sonuçlarla p21

ekspresyonundaki artışın hepatik hasara bir yanıt olarak ortaya çıktığını düşünmüştür.(31)

Bizim çalışma sonuçlarımızın önceki çalışma sonuçlarından farklı olmasının çeşitli nedenleri olabilir. Öncelikle olgu sayımızın önceki çalışmalarla kıyaslandığında daha çok olduğu ve homojen bir populasyon olarak yalnızca hepatit B olgularını içerdiğini hatırlatmalıyız. Yalnızca hepatit B hastalarını içeren bu kadar geniş bir seri yayımlanmamıştır. Kronik karaciğer hasarına yol açan başta hepatit C ve alkol olmak üzere diğer etyolojilerde karaciğer hasar mekanizmaları ve olası olarak hücre döngüsü regülasyonu hepatit B den farklılıklar gösterir. Alkolik karaciğer hasarında oksidatif stres ve sitokinler doku hasarında rol alırken, hepatit C virus infeksiyonunda, hepatit B infeksiyonunda olduğu gibi infekte hepatosite karşı oluşan poliklonal-multispesifik T hücre yanıtları karaciğer hasarından sorumludur. Bununla beraber, T hücre yanıtlarının şiddeti ve kalitesi her iki infeksiyonda farklılıklar gösterir. Hepatit B infeksiyonunda periferik kan ve karaciğerde ölçülebilen T hücre yanıtlarının şiddeti hepatit C infeksiyonuna göre daha azdır ve birçok hastada ölçülemez düzeyde bulunmaktadır. Hasara yanıt olarak ortaya çıkan karaciğer hücresi döngüsü, karaciğer hasarına yol açan efektör sistemlerden ayrılamaz çünkü hepatositi hücre siklusüne sokan oksidatif stres ve büyüme faktörleri/sitokinler (TNFalfa, TGFalfa ve beta) gibi immun hücrelerden salgılanan moleküller, hücre siklusunun değişik aşamalarında rol alırlar. TNFalfa, istirahattaki hücreleri döngüye sokan en erken uyarıcı oluşturur. Bu sitokinlerin ekspresyonunda etyolojiye ve hastalığın evresine bağlı farklılıklar söz konusudur. (3,36) Bu nedenlerle hücre siklusunu düzenleyen moleküllerin (ör. P21) ekspresyonları hasar yapan mekanizmaya ve hastalığın evresine göre değişebilir. Nitekim insan karaciğerinde kronik hepatit C'de hepatit B'ye göre p21 ekspresyonunun daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Karaciğerde p21

ekspresyonunun bu şekilde farklı etyolojilerle oluşan karaciğer hastalıklarındaki ekspresyon paterni daha çok hastayı içine alan serilerde çalışılmalıdır.

Bizim çalışmamızı önceki çalışmalardan ayıran bir özellik çalışmamızın sirozu olmayan hastaları kapsamasıdır. Bu yüzden minimal bir karaciğer hasarı ile siroza varan ciddi bir karaciğer hasarı arasındaki fark bizim çalışmamızda sınınamamıştır. Siroz/ciddi fibroz hastalarının dahil edilmemesi nedeniyle bizim sonuçlarımız p21 ekspresyonu ile karaciğer hasarı arasındaki ilişkide esasen histolojik inflamatuvar aktivite ile p21 ilişkisini yansıtmaktadır. Çalışma sonuçlarımız inflamatuvar aktivite ile p21 ekspresyonu arasında bir ilişki ortaya koyamamıştır. Teoride, karaciğerde süregiden inflamatuvar hasarla hücre nekrozunu takiben hücre siklusunun ve böylece hepatosit rejenerasyonunun uyarılması ve böylece siklusu kontrol eden p21 protein ekspresyonunun artması beklenir. Kronik karaciğer hastalığında hepatik fonksiyonları sürdürmede hepatosit proliferasyonunun majör önemi hepatosit kaybını kompanse etmektir. Normalde hepatositler sessizdir ve çok düşük rejenerasyon gösterirler. Kronik hepatitde, hepatosit yaşam süresinin 10-100 güne kısalması ile normalle kıyaslayınca artmış bir proliferatif aktivite beklenir.(1,3,5) Bununla beraber bizim çalışmamızda kronik hepatit olmayan karaciğer dokusu gibi bir kontrol grubumuz olmamakla beraber, inflamatuvar aktivite ile hepatosit proliferasyonunun göstergesi olan PCNA indeksi korelasyon göstermiyordu. Bu, minimal bir inflamatuvar aktivite ile hatırı sayılır inflamatuvar aktivite gözlenen durumlarda hepatosit proliferasyon hızında büyük değişimler olmadığı anlamına gelmektedir. Dolayısıyla p21 ekspresyonunun, inflamatuvar aktivite ile paralel olarak artmaması, hepatosit proliferasyon hızında inflamatuvar aktivitenin şiddetine bağlı büyük değişimler gözlenmemesi ile açıklanabilir. Hepatosit proliferasyon hızında belirgin değişimler, hücre kayıp hızının (fulminan hepatit) ve miktarının (fulminan hepatit ve siroz) çok olduğu durumlarda beklenir. Böylece hücre siklüsünü kontrol eden p21 gibi moleküllerin ekspresyonundaki majör değişimlerin, söz konusu bu

durumlarda beklenmesi daha akılcıdır. Hepatosit proliferasyonunun kronik olarak uyarıldığı sirotik gelişimde, p21 ekspresyonu hayati bir öneme sahip olabilir. Çünkü bu yüksek proliferasyon hızının hepatosellüler kansere giden bir dizi moleküler ve genetik değişimlere zemin hazırladığına inanılır. Bu noktada bir tümör supresör protein gibi davranan p21'in ekspresyonu ve gösterdiği fonksiyonel değişiklikler, hepatosellüler karsinogeneizde önemli olabilir. Bununla beraber, P21 proteinin karsinogeneizdeki rolü ile ilgili bilgilerimiz şu an için yetersizdir.

Bu çalışmada yukarıda söz ettiğimiz gibi inflamatuvar aktivite ile p21 ekspresyonu arasında bir ilişki gösteremediğimiz gibi, hepatosit proliferasyonu ile de bir ilişki gösteremediğimizi ve bunun gerekçelerini açıkladık. Hepatosit proliferasyonunun göstergesi olarak kullandığımız immunhistokimyasal PCNA ekspresyonunun ölçümü, güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmiştir. İlginç olan bir ilişki, P21'in in-vitro direkt olarak PCNA'yı inhibe ederek DNA sentezini önlediğinin gösterilmiş olmasıdır. Böylece, herhangi bir şekilde artmış p21 ekspresyonu, artmış hücre siklusunu değişik aşamalarda kontrol ederken, PCNA inhibisyonu yoluyla da DNA sentezini ve hücre siklusunu bloke edebilir. Hipotetik olarak hasara yanıt olarak artan hücre proliferasyonunu (PCNA indeksi) kontrol etmek için artan bir p21 ekspresyonu beklenir. Ancak p21'in, direkt PCNA inhibisyonu yapabildiği yönündeki in vitro gözlemler in vivo olarak geçerli ise, karaciğerde artan p21, PCNA düzeylerini azaltacak ve p21 ve PCNA arasında süregiden bir denge oluşturacaktır. Çalışmamızda p21 ve PCNA düzeyleri arasında bir pozitif korelasyon bulamamızın nedeni bu olabilir. Bu, kronik hepatit B hastaları üzerinde olmasa da başka etyolojili bazı karaciğer hastalıklarında elde edilen sonuçlarla desteklenmektedir. Nonalkolik steatohepatitli ve alkolik hepatitli hastaların bir kısmında hepatosit proliferasyonu ile p21 ekspresyonunun sabit bir ilişki içinde olmaması bulgularımızı desteklemektedir. Yine kronik hepatit C'li hepatosit proliferasyonu düşük olan hücrelerde, p21 ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur.(4) Bu bulgular, hepatosit proliferasyonunu

kontrol eden kompleks bir sistemin değerlendirilmesindeki güçlüklerle işaret etmektedir.

Çalışmamızda p21 proteini ekspresyonu ile hepatit B virüs replikasyonu arasında bir ilişki olup olmadığını da araştırdık. Bizim bilgilerimize göre böyle bir ilişki olup olmadığını sınavan bir çalışma yapılmamıştır. P21 proteini ve viral replikasyon arasındaki ilişkiyi araştırmanın temeli, hepatit B virüs replikasyonunun hücre siklusüne bağlı olabileceğine dair kanıtların var olmasıdır. Karaciğerde inflamasyon ve nekrozun olmadığı, dolayısı ile hepatositlerde artmış bir proliferasyonun beklenmediği immuntolerans fazı (HbeAg+ taşıyıcılık aşaması) yüksek viremi ile karakterlidir. Aksine immun temizlenme fazında karaciğerde nekroinflamasyonun, hepatosit proliferasyonunu artırması beklenir. Bu dönemde giderek viremi azalacak, eğer immun yanıt yeterli ise viral temizlik sağlanabilecektir. İn vitro olarak da hücre siklusünün istirahat fazında viral replikasyon hızlı iken, hepatositler hücre siklusüne girdiğinde, HBV replikasyonunun azaldığı kaydedilmiş, böylece HBV replikasyonunun hücre döngüsüne de bağlı olabileceği ileri sürülmüştü.(16,17,37,38) Bizim daha önceki bir çalışmamızda da HBV replikasyonu ile hepatosit proliferasyonu arasında bir ilişki olduğu ortaya konmuştu. (39) Bu temel üzerinde, hücre siklusünü kontrol eden p21 ile viral replikasyon ilişkisini sınıadığımızda bu iki parametre arasında bir korelasyon bulamadık. Bunun başlıca nedeni, hücre siklusününün kompleks olması ve bunu kontrol eden bir çok faktörün varlığı olabilir. P21 proteini ile viral replikasyon ve hepatit B proteinleri arasında direkt bir ilişki bugüne kadar sınıanmamış olmakla beraber böyle bir ilişki de pek olası görülmemektedir. Her ne kadar bir viral proteinle p21 arasında bir etkileşim olabileceğine dair kanıt yoksa da, yukarıda belirttiğimiz p53 inhibisyonu, p21 ekspresyonunu baskılayan bir unsur olabilir, çünkü p53, p21'i aktive eden önemli bir moleküldür. Eğer bu mekanizma işliyorsa, artan inflamatuvar aktiviteye rağmen hepatositte p21'in çok sıkı bir kontrol altında olmasının bir başka nedenini oluşturur.

Böylece HBV replikasyonunun, p21 protein ekspresyonunun bir fonksiyonu olmasından ziyade, tüm faktörlerin etkileşimi altındaki hepatosit proliferasyonuna bağlı olması daha olasıdır. Çalışmamızdaki temel amaç, HBV replikasyonu ve hepatosit proliferasyonu göstergesi olan PCNA ilişkisi olmadığından, hasta grupları içinde hatırı sayılır oranda, HBV DNA düzeyi ölçülemez seviyede olan hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Bu nedenle HBV DNA ve PCNA arasında önceki çalışmamızda gösterdiğimiz gibi, bir negatif korelasyon bulunamamıştır.(39) Buna ancak daha duyarlı kantitatif HBV DNA ölçüm yöntemleri, yeterli duyarlılıkta test ortamı sağlayabilir.

Sonuç olarak bu çalışmada kronik hepatit B'li hastalarda, karaciğer hasarı ve viral replikasyonla p21 proteini ekspresyonu arasında bir ilişki gösteremedik. Ancak hücre siklusunu kontrol eden en önemli protein olan p21'in kronik hasar ve HBV'ye bağlı hepatosellüler kanserde rolü olabilir. Bunu daha iyi anlayabilmek için, kronik hepatit aşamasındaki hastaların yanısıra, siroz ve/veya hepatosellüler kanser geliştirmiş hepatit B hastalarında da bu proteinin ekspresyonunun araştırılması bize ek bilgiler sağlayabilecektir. Ayrıca p53 ekspresyonunun, hastalığın tüm spektrumu içinde p21 ekspresyonu ile nasıl bir ilişki içinde olduğu sonraki çalışmalarda araştırılmalıdır. Ayrıca yeteri kadar olgu serilerinde hepatit B infeksiyonu ile, karaciğer hastalığına yol açan diğer etyolojilerde p21 ekspresyonunun karşılaştırılması, değişik etyolojilerde karaciğer rejenerasyonu ve hepatosellüler kanser gelişim mekanizmaları konusunda ek bilgiler sağlayacaktır.

## ÖZET

Hepatit B virüsü, nonsitopatik bir virüsdür ve hafif aktivite gösteren hepatitden, fulminan hepatit, kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler kanser gelişimine kadar gidebilen ,geniş bir hastalık grubuna yol açabilen, bir virüs olarak bilinir. Ülkemizde ve dünyada önemli bir mortalite ve morbidite sebebidir.

Kronik karaciğer hastalıklarında hepatosit proliferasyon mekanizmaları tam anlaşılmasa da, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan ve hücre siklüsünün ilerlemesini G1-S fazı geçişini kontrol ederek önleyen bir protein olan p21 proteininin, hepatosit proliferasyonunu düzenlediği kabul edilmektedir.

Diğer yandan hepatosit P21 ekspresyonu, yapılan az sayıda insan çalışmasında kronik karaciğer hastalıklarında, hastalık aktivitesi, inflamasyon ve fibrozis ile ilişkili bulunmuştur.

Bizde çalışmamızda hücre siklüsünde anahtar rol oynayan p21 proteininin, hepatosit proliferasyonu, hepatit aktivitesi ve HBV replikasyonu ile ilişkisinin olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamıza ocak 1997 ile mart 2001 tarihleri arasında AÜTF Gastroenteroloji kliniği ve polikliniğine başvuran 15-62 yaşları arasında, toplam 66 kronik Hepatit B hastası alındı. Hastaların tedavi öncesi dönemde alınan karaciğer biyopsileri, ALT, HBV DNA değerleri retrospektif olarak değerlendirilerek, hastalar 3 gruba ayrıldı. **1. grupta** HbeAg(+), ALT yüksek (>normal x 1.5 kat ) , HBV DNA yüksek (hibridizasyon ile >5 pg/ml ) olan 27 hasta

**2.grupta** HBeAg(-), ALT yüksek (>normal x 1.5kat ), HBV DNA yüksek (>5pg/ml) olan 22 hasta,

**3. grupta** ise HBeAg(-), ALT normal, HBVDNA ölçülemez düzeyde ( <5 pg/ml ) olan 17 hasta yer alıyordu.

Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından fark yoktu. 1. ve 2. grup, klinik ve histopatolojik olarak aktif hastalığı olan hastalık grubunu gösterirken, 3. Grup minimal hastalığı olan hastaları içeriyordu.

Tüm hasta gruplarında parafin bloklardan hazırlanmış biyopsi materyellerinde, hepatosit proliferasyonunu gösteren PCNA ile CDK inhibitörü olan ve hücre proliferasyonu durduran bir protein olan P21'in boyanma paternleri, immünohistokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak çalışıldı. Değerlendirmeler her vakada 1000 hepatosit sayılarak, pozitif kırmızı-kahverengi nükleer boyanma olan hepatositlerin yüzdesi alınarak (Labeling index) yapılmıştır. Olguların histolojik aktivite indeksleri ve evrelendirmeleri Hematoksilen Eozin ve Van Giesson Trikrom kesitlerde değerlendirilmiştir.

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, gerek tüm hasta grupları beraber değerlendirildiğinde, gerekse her bir grup kendi içinde ayrı olarak değerlendirildiğinde, P21 boyanma / boyanmama durumu ( p21+ ve p21- ) ile ALT, HBV DNA, PCNA ve HAI skorları arasında bir ilişki bulunamadı.(p>0.05)

HAI ≤ 8 (düşük hastalık aktivitesi), HAI > 8 (yüksek hastalık aktivitesi) olan hastalar değerlendirildiğinde, p21 ekspresyonu ile aralarında bir ilişki olmadığı görüldü. Her bir parametrenin korelasyon analizleri yapıldığında, 3 grubun önceden belirlenen özellikleri olan ALT, HBV DNA ve HAI ile P21 ve PCNA arasında anlamlı korelasyon bulunamadı. (P>0.05)

Önceleri yapılan hücre kültür sistemleri ve invivo karaciğer rejenerasyon modellerinde, hepatosit proliferasyonu ve P21 ekspresyonu arasında farklı sonuçlar alınması, son zamanlarda insan çalışmalarının artmasına yol açmıştır. Ancak buna rağmen, özellikle kronik hepatitlerde az sayıda hasta grupları ile yapılmış çalışmalar halen yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmaların çarpıcı sonuçları olmakla beraber, bu sonuçlardan genelleme yapılabilmesi zor görülmektedir.

Bu az sayıdaki kronik Hepatit B, Hepatit C ve siroz vakalarında, hepatosit proliferasyonu ile P21 ekspresyonu korele bulunmakla birlikte, inflamasyon ve fibrosiz ile olan korelasyonun daha fazla olduğu bildirilmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda kronik hepatit B'li hastalarda, karaciğer hasarı ve viral replikasyonla p21 protein ekspresyonu arasında ilişki görülmedi. Ancak hücre siklusunu kontrol eden p21 proteininin, HBV'ye bağlı kronik hasar ve hepatoselüler kanserde rolü olabilir. Bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.



## KAYNAKLAR

1. Ozer A, Khaoustov VI, Mearns M et al: Effect of hepatocyte proliferation and cellular DNA synthesis on hepatitis B virus replication. *Gastroenterology* 1996;110:1519-1528
2. Pui-Chee WU, Fang J.WS, Lai CL et al: Hepatic expression of hepatitis B virus genome in chronic hepatitis B virus infection. *Am J Clin Pathol* 1996; 105:87-95
3. Hoffman AL, Rosen HR, Ljubimova JU et al: Hepatic regeneration: current concepts and clinical implications. *Seminars in liver disease.* 1994; 14,No.2:190-210
4. Crary GS, Albrecht JH: Expression of Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human liver. *Hepatology* 1998;28:738-743
5. Ehrenfried JA, Ko TC, Thompson EA , Evers BM: Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery* 1997;122:927-935
6. Masaki T, Shiratori Y, Rengifo W et al: hepatocellular carcinoma cell cycle: Study of Long-Evans Cinnamon rats. *Hepatology* 2000;32:711-720
7. Matthias P, Herskowitz I: Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 1994;79:181-184
8. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF et al: New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes & Development* 1997;11:847-862
9. Chu CM, Liaw YF: Immunohistological study of intrahepatic expression of hepatitis B core and E antigens in chronic type B hepatitis. *Journal Of Clinical Pathology* 1992;45:791-795
10. Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE et al: Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of Woodchuck hepatitis virus. *Journal Of Virology* 1997;71:9392-9399

11. Han J, Yoo HY, Choi BH, Rho HM: Selective transcriptional regulations in the human Liver cell by hepatitis B viral X protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;272:525-530
12. Zuckerman AJ, Zuckerman JN. Viral hepatitis. In: Weatherall DJ, Ledingham J.GG, Warrell DA, eds. *Oxford Textbook of Medicine*, Third edition, Volume 1, 1996; 448-460
13. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Acute viral hepatitis. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, eds. *Harrison's Principles Of Internal Medicine*, 14<sup>TH</sup> Edition, Volume 2, 1998;1672-1692
14. Ustaçelebi Ş. Hepatit B virusu moleküler biyolojisi ve serolojisi. In: Uzunalımoğlu Ö, Kocabalkan F, Mas MR ,eds. *Kronik Viral Hepatitler Mayıs 2000*; 1-7
15. Guidotti LG, Matzke B, Chisari FV: Hepatitis B virus replication is cell cycle independent during liver regeneration in transgenic mice. *Journal Of Virology* 1997;71:4804-4808
16. Pui-Chee WU, Johnson YN, Lau TK et al: Relationship between intrahepatic expression of hepatitis B viral antigens and histology in Chinese patients with Chronic hepatitis B virus infection. *American Journal Clinical Pathology* 1993;100:648-653
17. Chu CM, Yeh CT, Chien RN et al: The degrees of hepatocyte nuclear but cytoplasmic expression of hepatitis B core antigen reflect the level of viral replication in chronic hepatitis B virus infection. *Journal Of Clinical Microbiology* 1997;35:102-105
18. Ehrenfried JA, Ko TC, Thompson A, Evers M: Cell Cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery* 1997;122:927-935

19. Albrecht JH, Meyer AH, Hu MY: Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene expression in hepatic regeneration. *Hepatology* 1997;25:557-563
20. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Nature* 1987;326:515-517
21. Kurki P, Ogata K, Tan EM: Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen(PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 1988;109:49-59
22. Nakamura T, Hayama M, Sakai T et al: Proliferative activity of hepatocytes in chronic viral hepatitis as revealed by immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen. *Human Pathology* 1993; 24: 750-753
23. Akyol G, Dursun A, Poyraz A et al: P53 and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) expression in non-tumoral liver diseases. *Pathology International* 1999;49:214-221
24. Delhaye M, Louis H, Degraef C et al: Relationship between hepatocyte proliferative activity and liver functional reserve in human cirrhosis. *Hepatology* 1996;23:1003-1011
25. Kawakita N, Seki S, Sakaguchi H et al: Analysis of proliferating hepatocytes using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen/cyclin in embedded tissues from various liver diseases fixed in formaldehyde. *American Journal of Pathology* 1992;140: 513-520
26. Ojanguren I, Ariza A, Llatyos M et al: Proliferating cell nuclear antigen expression in normal, regenerative, and neoplastic liver. *Human Pathology* 1993;24: 905-908

27. Tzang BS, Chen TY, Hsu TC et al: Presentation of autoantibody to proliferating cell nuclear antigen in patients with chronic hepatitis B and C virus infection. *Ann Rheum Dis* 1999;58:630-634
28. Koçak SK, Beksaç M: Hematolojik malign hastalıklarda siklin ve inhibitörlerinin hücre döngüsü ile ilişkisinin akım sitometrik olarak saptanması. *Ankara Üniversitesi Uzmanlık Tezi* 2001:3-26
29. Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-1823
30. Sherr CJ: G1 phase progression: Cyclin on cue. *Cell* 1994;79:551-555
31. Wagayama H, Shiraki K, Yamanaka T et al: p21 Expression and hepatitis virus type. *Digestive Diseases and Sciences* 2001;46:2074-2079
32. El-Diery WS, Tokino T, Velculescu VE et al: WAF1, a potential mediator of P53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-825
33. Skapek SX, Rhee J, Spicer DB, Lassar AB: Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science* 1995;267:1022-1024
34. Sherr J, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development* 1995;9: 1149-1163
35. Kaita KDE, Pettigrew N, Minuk GY: Hepatic regeneration in humans with various liver disease as assessed by Ki-67 staining of formalin-fixed paraffin-embedded liver tissue. *Liver* 1997;17:13-16
36. Kann M, Gerlich H. Replication of hepatitis B virus. In: Harrison TJ, Zuckerman AJ, eds. *The molecular medicine of viral hepatitis*. London: John Wiley and Sun Ltd; 1997; 63-87.
37. Hsu HC, Su IJ, Lai MY, et al. Biological and prognostic significance of hepatocyte hepatitis B core antigen expressions in the natural course of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1987; 1: 45-50.

38. Franca STM, Kiyosawa K, Imai Y, et al. Change of intrahepatic expression of hepatitis B core antigen during the clinical course of type-B chronic hepatitis. Scand J Gastroenterol 1989; 24: 454-60.
39. Serinöz E, Varlı M, Erden E et al: Nuclear localization of hepatitis B core antigen and its relations to liver injury,hepatocyte proliferation and viral load. 2002( Yayınlanmak üzere gönderildi.)



TC YÜKSEKÖĞRETİM VE ARAŞTIRMA BAKANLIĞI  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ