

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KRONİK HEPATİT C, KRONİK HEPATİT B VE NASH
HASTALARININ SERUM PİN1 PROTEİN DÜZEYLERİ İLE
DEMOGRAFİK, KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. MUSTAFA CENGİZ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. SEREN ÖZENİRLER**

**ANKARA
ARALIK 2013**

KABUL VE ONAY

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ TUTANAĞI

Adı Soyadı	MUSTAFA CENGİZ
Baba Adı	NUSRETTİN
Doğum yeri/ Tarihi	GERCÜŞ22/10/1978
Diploma tarihi/Diploma No	2003/03311112
Mezun Olduğu Fakülte	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
İhtisas Yaptığı Ana Bilim Dalı/ Bilim Dalı	GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI
İhtisas Süresi	3 YIL
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	GAZİ ÜNİV.TIP FAKÜLTESİ

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Kronik hepatit C, Kronik hepatitB ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalarında serum PIN-1 protein düzeyinin değerlendirilmesi

TEZ SAVUNMA TARİHİ: 21/10/2013

JÜRİ KARARI: Tezi başarılı ve uygun bulunmuştur.

JÜRİ ÜYELERİ

TEZ DANIŞMANI


Prof.Dr. Seren ÖZENİRLER


ÜYE
Prof. Dr. İbrahim DOĞAN


ÜYE
Doç. Dr. Mehmet ARHAN

ÖNSÖZ

Gastroenteroloji uzmanlık eğitimi döneminde gösterdiği yakın destek ve ilgiden dolayı tez hocam sayın Prof. Dr. Seren Özenirler'e, Bilim Dalı başkanımız sayın Prof.Dr. Selahattin Ünal'a, bölümdeki diğer değerli hocalarıma, uzman arkadaşlarıma, tez çalışmasında serum çalışmalarıyla desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Ayşegül Yücel Atak'a teşekkürü borç bilirim.

Son olarak yoğun desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

Dr. Mustafa CENGİZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. NASH	3
2.1.1. Patogenez	5
2.1.2. Histopatoloji.....	7
2.1.3. Tanı	8
2.1.4. Karaciğer biyopsisi	9
2.2. HEPATİT C	10
2.2.1. Tanım ve epidemiyoloji	10
2.2.2. Etyopatogenez	10
2.2.3. Histopatoloji.....	11
2.2.4. HCV ve Steatoz.....	12
2.2.5. HCV ve Fibrozis	12
2.2.6. Tedavi.....	14
2.3. HBV	15
2.3.1. Tanım ve Epidemiyoloji.....	15
2.3.2. HBV Enfeksiyonunda Doğal Seyir	16
2.3.3. Histopatoloji.....	16
2.3.4. Klinik Özellikler ve Tanı	18
2.3.5. Tedavi.....	18
2.3.6. HBV ve Steatoz.....	19

2.4. PIN-1 Protein	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Hastalar	22
3.2. Serum PIN-1 Düzeyinin Ölçülmesi	24
3.3. Karaciğer Biyopsilerinin Değerlendirilmesi	28
3.4. Etik Kurul	30
3.5. İstatistiksel Analizler	30
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA.....	38
6. SONUÇLAR	43
7. KAYNAKLAR.....	45
8. ÖZET	59
9. SUMMARY	61
10. ÖZGEÇMİŞ.....	63

SİMGELER ve KISALTMALAR

HCV	: Hepatit C virüsü
HBV	: Hepatit B virüsü
NASH	: Non-alcoholic steatohepatitis
NAFLD	: Non-alcoholic fatty liver disease
VKI	: Vücut kitle indeksi
PPAR	: peroxisomal proliferatör-activated reseptör
H-E	: Hemotoksilen-Eozin
HCC	: Hepatocelullar carcinom
DM	: Diabetes Mellitus
ROS	: Reaktif oksijen radikalleri
SOCS3	: Sitokin süpressör tip 3 sinyali
IRS -12	: İnsülin reseptör substrat tip 1 ve 2
TGF- α	: Tümör growth faktör- α
PIN-1	: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
TGFb 1	: Transforming growth factor b 1
GM-CSF	: Granulocytemacrophage colony-stimulating factor
NIA	: Nekroinflamatuvar aktivite skoru

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. Basit steatozun histolojik bulguları	3
Şekil 2. NASH histolojik özellikleri	8
Şekil 3. HCV enfeksiyonunda apoptozisin fizyopatolojik yolları gör÷lmektedir.....	14
Şekil 4. Pin1 protein yapısı	20
Şekil 5. Hasta ve kontrol gruplarının serum Pin-1 düzeylerinin karşılaştırılması.....	34

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarının demografik/klinik özelliklerinin karşılaştırılması.....	32
Tablo 2. Hasta ve kontrol gruplarının serum Pin-1 ve kan değerlerinin karşılaştırılması.....	33
Tablo 3. Gruplar arasında lipid profillerinin karşılaştırılması.....	35
Tablo 4. NASH hastalarında serum Pin-1 düzeyi ile histopatolojik özellikler arasındaki ilişkiler	35
Tablo 5. HCV-HBV hastalarının histolojik özellikleriyle serum Pin1 düzeyi arasındaki ilişki.....	36
Tablo 6. NASH hastalarında ileri fibrosis için Univariate analiz sonuçları	37
Tablo 7. NASH hastalarında ileri fibrozis için Multivariate analiz sonuçları	37

1. GİRİŞ

Dünyada kronik hepatit C Virüs (HCV) seroprevalansının yaklaşık olarak %3 yani toplamda 170 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Değişik ülkelerde hastalığın prevelansı ortalama %1,3-15 arasında değişmektedir (1, 2). Kronik Hepatit B (KHB) ise ortalama olarak 400 milyon insanda görülmektedir ve bu her iki enfeksiyon da karaciğer sirozu ve karaciğer kanserine neden olarak ölüme yol açabilmektedir (3).

Alkolik olmayan yağlı karaciğer (NAFLD) hastalığı sıklığı artmaktadır ve toplumda yaklaşık olarak %10-24 arasında değişmektedir (4). NAFLD, alkol kullanımı olmadan makroveziküler yağlanmayla giden bir hastalıklar spektrumudur.

Karaciğer yağlanması, karaciğerdeki yağlanmanın dağılımı, sekresyon veya metabolize olması arasındaki dağılıma bağlı olarak meydana gelmektedir. Hepatosit sitoplazmasında aşırı lipid birikmesine bağlı olarak karaciğer yağlanması meydana gelmektedir. Karaciğerde metabolize edilen yağ dokusunun üzerinde yağ infiltrasyonu olmasıyla yağlanma meydana gelmektedir. Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğer yağlanması sık görülmektedir ve bunun fibrozisin ilerlemesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (5). Kronik HBV enfeksiyonunda ise yapılan az sayıdaki çalışmada karaciğer yağlanmasının normal popülasyona benzer düzeyde görüldüğü tespit edilmiştir (6).

Karaciğer fibrozisi, non-alkolik steatohepatit (NASH), kronik HCV ve kronik HBV hastalarında hastalık ilerledikçe ve tedavisiz kaldıkça artmakta bunda

değişik mekanizmalar yer almaktadır. Bu süreçte oksidatif stress, inflamasyon ve değişik yolların olduğu bilinmektedir.

Pin1 proteini, PPIaz ve WW adlı 2 bölümü olan ve izomerizasyondan sorumlu olabilen bir proteindir. Yapılan bazı deneysel fare çalışmalarında Pin1 proteinin NASH hastalığına bağlı gelişen steatozis ve fibroziste görev aldığı gösterilmiştir (7). Ayrıca başta Alzheimer olmak üzere değişik hastalıkların fizyopatogenezinde rolü olduğu bilinmektedir (8, 9). Bunun yanısıra başta meme olmak üzere bazı kanserlerin hem fizyopatogenezinde hem de progresyonunda yeri olduğu düşünülmektedir (10, 11).

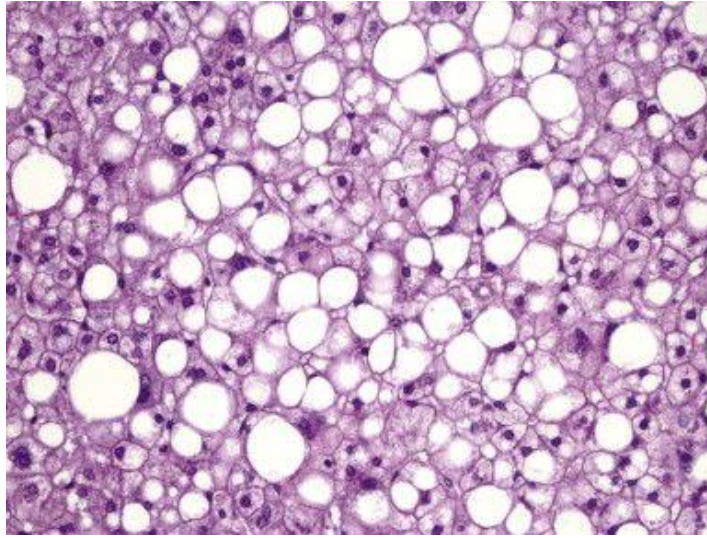
Ayrıca son zamanlarda yapılan deneysel bir çalışmada böbrek fibrozisi oluşturulmuş farelerde Pin1 inhibisyonu ile fibrozisin geriletildiği gösterilmiştir (12).

Bu çalışmanın amacı serum PİN-1 proteinin düzeyinin sağlıklı kontrol grubu, NASH ve kronik viral hepatit hastalarında belirlemek, bu hasta gruplarında biyokimyasal ve histopatolojik değişikliklerle olan ilişkisini değerlendirerek, yağlanma ve fibrozisi tahmin etmede tanısal bir belirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmaktır. Pin1 proteini, bu hastalıklarda daha önce çalışılmamıştır. Bu hastalıkların tanısı ve prognozundaki gösterge olabilme özelliği açısından hem klinik olarak önemli hem de özgün bir çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NASH

Alkolik olmayan yağlı karaciğer, karaciğerde hasara neden olacak düzeyde alkol olmamasına rağmen histolojik olarak makroveziküler karaciğer yağlanmasıyla ilişkili geniş bir hastalık spektrumudur. Basit karaciğer yağlanmasından inflamasyonun eşlik ettiği steatohepatit ve fibrozise kadar ilerleyebilen bir hastalıklar spektrumudur. Basit karaciğer yağlanması NAFLD'nin ana histolojik bulgusudur.



Şekil 1. Basit steatozun histolojik bulguları

Basit steatoz (yağlı karaciğer)'un histolojik özellikleri. Karakteristik özelliği diffüz makroveziküller steatozis. Glkojenize nukleuslar yaygın olarak görülür (Hematoxylin ve eozin H&E).

Normalde serbest yağ asitleri ya barsaklardan emilerek ya da adipoz dokunun yıkımı sonucu karaciğere gelirler ve trigliserid olarak depolanırlar. Karaciğerde yağ asidi metabolizması sıkı kontrol altında tutulmaktadır ancak lipogenez arttığı zaman karaciğerde yağ birikmesi yönünde denge bozulmaktadır. Artmış serbest yağ asitleri değişik mekanizmalarla karaciğere toksik hale gelmektedir (13, 14). NAFLD, karaciğer ile ilişkili morbidite ve mortalite sebebi olarak giderek artan bir şekilde tanınmaktadır. 1980 yılında Ludwig ve arkadaşları alkol kullanmayan ancak karaciğer enzim yüksekliği olan orta yaşlı hastaların karaciğer biyopsilerinde alkolik hepatite benzer histolojik bulguları mevcut olan karaciğer hasarını tanımlayan “nonalkolik steatohepatit” (NASH) terimini kullanmışlardır (15). NAFLD’nin tanımlandığı spektrum, basit yağlı karaciğerden, yağlı değişikliklerle birlikte lobüler inflamasyon, hepatoselüler hasar, Mallory cisimcikleri, ilerleyici fibrozis ile karakterize NASH’a kadar uzanmaktadır. ABD’de NAFLD erişkin nüfusun %20’sinde görülürken, steatohepatit %2-3’ünde görülür (16). Karaciğer yağlanması, lipidlerin karaciğer ağırlığının %5’inden fazlasını oluşturması veya histopatolojik incelemede hepatositlerin %5’ten fazla yağ vakuolü içermesi olarak tanımlanır.

İlerlemiş NAFLD hastalarında sık olarak görülen fibrozis henüz tam olarak netleşmemiş bir konudur. Karaciğer fibrozisi Disse’nin subendotelyal alanında hepatic stellat hücrelerinin aktivasyonu ve proliferasyonu sonucu meydana gelir ve sonrasında kollojen tip1-3’de içinde olduğu ekstraselüler matrix sekresyonu meydana gelir (17).

NASH dünya genelinde sıklığı giderek artan, fizyopatolojisinde yaşam tarzı ve genetik faktörlerin önemli rol oynadığı karmaşık bir metabolik durum olan NAFLD'nin en ciddi formudur. Kronik karaciğer hastalığı ve siroza ilerleyebilmesinin yanı sıra obezite, diyabet, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve hiperlipidemi kapsayan metabolik ve insülin rezistans sendromu ile kardiyovasküler hastalıklarla da çok sıkı birliktelik göstermesi bu hastalığın önemini giderek arttırmaktadır.

Obezite, (Vücut Kitle İndeksi (VKI) $>30\text{kg/m}^2$) NASH ile açıkça ilişkilidir. Yağlı karaciğer prevalansı kilo alımıyla artar. Yağlı karaciğerin normal kilolu kişilerdeki prevalansı %10-15 iken obezlerde %70-80'lere kadar çıkabileceği bildirilmiştir. Steatohepatit ise obez olmayanlarda yaklaşık %3 iken, morbid obezlerde bu oran %15-20'lere kadar çıkabilmektedir (4, 18, 19). Yağlı karaciğer ve NASH tüm yaş gruplarında görülebilir. En yüksek prevalansı 40-49 gibi orta yaşlarda görülebilmektedir. Önceleri kadınlarda daha sık görülürken son zamanlarda kadın ve erkeklerde aynı oranda görülmeye başlanmıştır. NAFLD'nin obezite, hiperinsülinemi, periferik insülin direnci, diyabet, hipertrigliseridemi ve hipertansiyon ile karakterli metabolik sendromun hepatik komponenti olduğunu gösteren kanıtlar artmaktadır

2.1.1. Patogenez

NASH'in patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamışsa da, Day ve James tarafından geliştirilen çift vuruş teorisi en çok kabul gören hipotezdir (20). Bu teoriye göre ilk vuruşda insülin direnci gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak

karaciğerde yağ depolanması artmakta ve sağlıklı karaciğer steatotik hale gelmektedir. İnsülin direnci ve hiperinsülinemi periferik dokularda lipolize, karaciğere serbest yağ asidi akışına ve karaciğerde endojen yağ asidi sentezine neden olmaktadır. Artmış serbest yağ asitleri de insülin reseptör substratını downregüle ederek insülin direncine katkıda bulunur. Karaciğerde ise insülin serbest yağ asidi sentezini arttırmanın yanı sıra VLDL partiküllerinin parçalanması yoluyla da trigliserid depolanmasını arttırır ve sonuçta steatoz oluşur. Bu yağlı değişim organın ikinci vuruşa karşı duyarlılığını arttırmaktadır. Ardından oksidatif stres ve adipositokinler aracılığı ile hepatosit hasarı, inflamasyon ve sonuçta fibrozis gelişimi ile karakterize ikinci vuruş gerçekleşmektedir. Artmış serbest yağ asitleri lizozomların zarlarının parçalanmasına ve TNF- α 'nın uyarılmasına neden olur. Ayrıca stokrom P450 enzimleri uyarılarak serbest oksijen radikallerinin üretilmesini arttırırlar. Serbest yağ asitleri peroxisomal proliferatör-activated reseptör-alfa (PPAR- α)'nın uyarılmasına neden olur. PPAR- α serbest yağ asidi oksidasyonunu arttırırken oksidatif stresi de arttırır. Bununla birlikte PPAR- α 'nın karsinogeneze zemin hazırladığı da bilinmektedir. Yağlı karaciğerde mitokondrilerde ATP sentezinin bozulmuş olduğu da öne sürülmektedir (21). Mitokondriler reaktif oksijen radikallerinin esas hücrel kaynaklarıdır ve lipid peroksidasyonu, sitokin uyarılması ve Fas ligandının uyarılması yoluyla steatohepatit ve fibrozisi tetikleyebilirler (21).

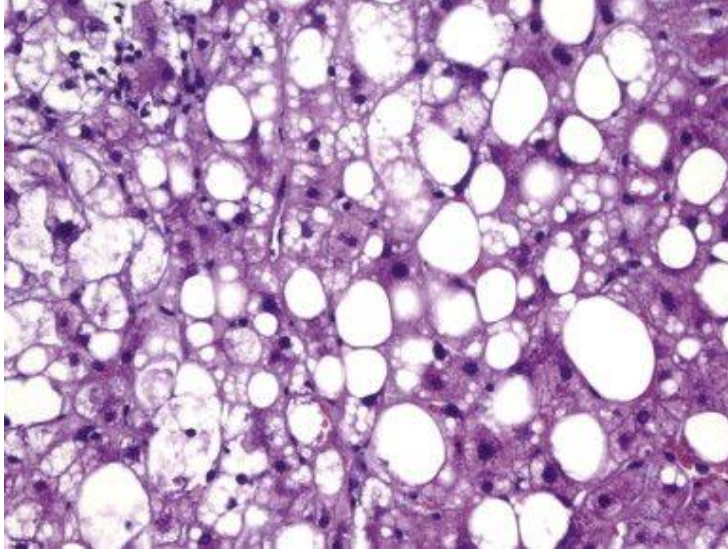
Obezite, tip 2 diyabet mellitus, steatoz arasındaki ilişki uzun zamandır bilinmektedir. İnsülin direnci yağlı karaciğer gelişiminde en sık görülen risk

faktörü olarak görünmektedir. Hatta bazı araştırmacılar yağlı karaciğer varlığının insülin direncinin çok erken bir göstergesi olduğunu öne sürmektedirler. Diyabet, hiperglisemi ve glukoz intoleransı yağlı karaciğerde sık görülür. Aslında normal glukoz toleransı olan zayıf yağlı karaciğer hastalarında dahi insülin direnci ve hiperinsülinemi görülür. Karaciğer insülin direnci olan hastalarda sıklıkla fark edilmeyen bir hasar yeridir. Bu tabloda kronik karaciğer hasarı genellikle sessiz olarak ilerler. Kriptojenik siroz nedeniyle takip edilen hastalarda obezite ve diyabet daha sık bulunmuş ve bu da hastaların önemli bir kısmında altta yatan etyolojinin NASH olabileceğini düşündürmüştür (22).

2.1.2. Histopatoloji

NAFLD'nin bir komponenti olan NASH alkolik hepatitten histolojik olarak ayrılabilir. Steatoz tüm hastalarda diffüz veya öncelikle santral zonü etkileyecek şekilde görülür. Steatoz derecesi hastanın VKI'sı ile ilişkili ve alkolik hepatitte görülenden daha ciddidir (23). Lobüler inflamasyon, NASH'ın ana histolojik bulgusudur ve lenfosit, diğer monositik hücreler ve polimorfonükleer lökositlerin infiltrasyonu ile karakterizedir (24). Glikojenize nükleus görülebilir. Değişik evrelerde hepatosit balonlaşması ve nekrozu görülebilir ve bunların varlığı hastalığın ciddiyetiyle ilişkilidir (25, 26). Küçük, seyrek ve göze çarpmayan Mallory cisimcikleri sık olarak görülür. Hafif demir boyanması hastaların yaklaşık olarak %50'sinde görülür. NASH tanısı olan hastaların %37-84'sinde periselüler, perisünozoidal ve periportal fibrozis görülebilmektedir. Fibrosis yaygınlığı damar etrafındaki hassas tellerin tutulumu veya hücre gruplarının tutulumu ile karakterli

hafif form olabileceği gibi hepatik yapıyı bozabilecek yoğun fibrotik septalar ile karakterize olabilir. En sık terminal hepatik ven etrafındaki zon 3'te görülebilen perisinuzoidal fibrozis en sık görülen formdur (27). NAFLD tanısı olan hastaların ilk biyopsisinde siroz görülme sıklığı ise %7-16 arasında değişmektedir. Siroz gelişme riski ciddi obezitesi olan hastalarda daha yüksek bulunmaktadır. NAFLD'a bağlı sirozda NAFLD'ın karakteristik histolojik özellikleri ya çok az veya hiç bulunmayabilir ve bundan dolayı kriptojenik siroz olarak tanımlanmış olur (28, 29).



Şekil 2. NASH histolojik özellikleri

Non-alkolik stetaohepatitin histolojik özellikleri. Diffüz veya perivenüller makroveziküller yağlanma görülmektedir. Nötrofil, lenfosit ve diğer monosit hücrelerden oluşan lobüler inflamasyon. Hepatosit balonlaşması ve değişik derecelerde nekroz ana ayırıcı özelliklerdir. Glikojenize nukleuslar görülmektedir. Küçük, seyrek ve gözden kaçabilecek mallory cisimcikleri görülmektedir. (Hematoxylin ve Eosin).

2.1.3. Tanı

NASH tanısı için net histolojik tanı kriterleri henüz net olarak ortaya konamamıştır.

NAFLD tanısı klinik ve histolojik kriterlere göre konur. Hastaların büyük çoğunluğu ya karaciğer enzim yüksekliği ve /veya karaciğer büyümesi nedeniyle araştırılmaktadır. NAFLD tanısı aşırı alkol kullanımının olmadığı ve laboratuvar testleriyle diğer karaciğer hastalıklarının dışlandığı durumlarda düşünülmelidir. Radyolojik çalışmalar yağlı karaciğeri gösterebilir. Karaciğer biyopsisi tanı konması için altın standarttır ve NAFLD'ı basit yağlanmadan ayıran yegane metoddur. Ancak fibrozisi göstermede kullanılabilecek girişimsel olmayan metodlar ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

2.1.4. Karaciğer biyopsisi

NAFLD tanısı koymada karaciğer biyopsisi tartışmalı bir konudur. Birçok otör NAFLD'ın klinik ve laboratuvar değerlendirmesiyle diğer karaciğer hastalıklarının dışlamasıyla ile tanı konabileceğini söylemektedir. Karaciğer biyopsisi sonucuyla hastalığın tedavisinde herhangi bir değişiklik olmayacağı için biyopsi tüm hastalara önerilmemektedir. En uygun yaklaşım biyopsi sonucuna göre tedavisi değişebilecek hastaların seçimi olarak görülmektedir. Obez, uzun veya kalıcı anormal karaciğer biyokimyasal testleri olan, yaşlı hastalar, metabolik sendromun birçok komponentini taşıyan hastalar, AST/ALT>1 olması, ciddi biyokimyasal testlerin yüksekliği, portal hipertansiyon semptom ve bulguların olması veya görüntüleme metodlarıyla fibrozis varlığının görülmesi ilerlemiş hastalıkla ilişkili olabilir ve bu grup hastalarda daha agresif tedavi protokolleri uygulanabilir (26, 30).

2.2. HEPATİT C

2.2.1. Tanım ve epidemiyoloji

HCV genomu 9600 nükleotid içeren tek sarmallı RNA molekülüdür. Flaviviridea ailesine mensup olan küçük zarflı bir virüstür. Altı ana HCV genotipi ve 50'den fazla alt grubu tanımlanmıştır (31). HCV, infekte olan hastaların yaklaşık olarak %75'inde kronik hastalığa neden olabilir. Akut hepatitis C asemptomatik olduğu için klinikte nadir olarak görülür. Yaklaşık olarak %10 hastada sarılık görülebilmekle birlikte %20-30 hastada halsizlik bulantı kusma gibi non-spesifik semptomlarla ortaya çıkar. Kronik HCV, asemptomatik kronik infeksiyondan siroz ve hepatoselüler karsinomaya kadar farklı tablolarla karşımıza çıkan bir hastalık olmakla beraber karaciğer dışı (kriyoglobulinemi, glomerülonefritler vs.) patolojilere de neden olabilmektedir. Dünya genelinde kronik hepatit, siroz ve HCC gibi karaciğer hasarına bağlı gelişen ölümlerin yaklaşık %35-70 gibi bir kısmından kronik HCV infeksiyonu sorumludur (32).

2.2.2. Etyopatogenezi

HCV esas olarak kan yoluyla bulaşan bir infeksiyon olmakla beraber cinsel yolla veya daha az olarak da vertikal geçiş yolu ile bulaşabilmektedir. HCV'ye ilk maruz kalındıktan sonra 1 ila 3 hafta içinde HCV-RNA kanda saptanabilir. Anti-HCV yanıtı ise 15 gün ile 3 ay içinde görülür. Periferik kanda ve dendritik hücrelerde HCV replikasyonu olabildiği gösterilmiş olmakla birlikte karaciğer viral replikasyonun olduğu ana yer olarak görülmektedir (33). Hepatosit yüzeyine virüsün bağlanmasından sonra sitoplazma içine giren HCV kılıfından

ayrılır ve viral RNA serbestleşir. Sitoplazmada viral proteinlerin sentezinden sonra HCV tekrar kana geçer veya komşu hepatositlere bağlanır. Karaciğer hasarı immün yanıt aracılığıyla olmaktadır. Her ne kadar HCV enfeksiyonu sonrası viral temizlenme için önemli olsa da immün yanıt aynı zamanda hepatosit yıkımı ve fibrozise yol açar ve virusun tamamen ortadan kaldırılması için yeterli olmaz. HCV'nin doğal seyri kişiden kişiye farklılık göstermekle birlikte ırklar arasında da farklılıklar görülebilir. Bazı hastalarda 15 yıl içinde siroz gelişirken, bazılarında bu süreç 30 yıla kadar uzar, bazılarında ise hiçbir zaman bu safhaya ilerleme olmaz. Bu süreçte yaş ve cinsiyetin hastalık progresyonunda önemi olduğu bulunmuştur (34). Viral faktörler hem direkt viral proteinlere bağlı hücre hasarıyla, hem de neden oldukları immün yanıtla karaciğer hasarına neden olurlar. Bağışıklık sistemi baskılanmış transplant hastalarında karaciğerde minimal bir inflamatuvar yanıt görülmesine rağmen yüksek HCV RNA seviyeleri ile ciddi karaciğer disfonksiyonu görülmesinin nedeni HCV'nin direkt sitopatik etkisine bağlıdır ancak HCV enfeksiyonunda esas mekanizma hücresel immün yanıtın uyarılmasıdır (35).

2.2.3. Histopatoloji

Kronik HCV ile infekte olan hastaların karaciğer histopatolojik bulguları minimal periportal lenfositik infiltrasyondan, köprüleşme fibrozisi, hepatosit nekrozuyla seyreden aktif hepatite ve siroza kadar olan geniş bir dağılım gösterir. HCV'ye bağlı hepatitte sinüzoidlerde daha sık lenfositoz, mallory cisimcikleri bulunması, hafif derecede makro ve mikroveziküler steatoz, portal alanlarda

lenfositik infiltrasyon görülmekle beraber nekroinflamasyon ve fibrosis de görülebilen bulgulardır (36).

2.2.4. HCV ve Steatoz

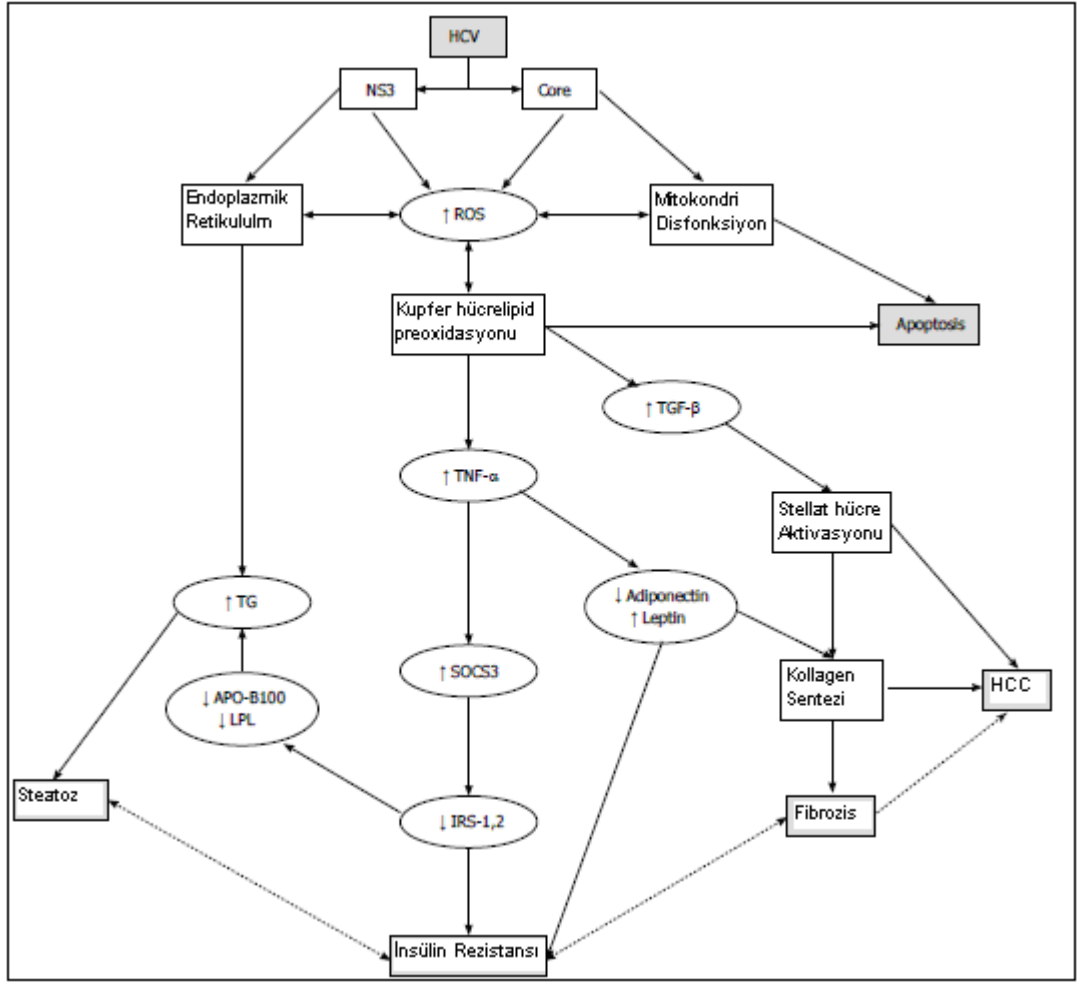
Kronik HCV ile infekte olan hastaların karaciğer biyopsilerinde karaciğer yağlanması yaklaşık olarak %50 oranında görüldüğü tespit edilmiş ve bunun HCV hastalarının progresyonunda klinik takibinde yer alabileceği tahmin edilmektedir. Kronik Hepatit C’de steatoz varlığının hem nekroinflamatuvar aktiviteyi hem de fibroze ilerleme hızını arttırdığı saptanmıştır. HCV’de saptanan steatozun virüse veya konağa ait faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir (37). Viral faktörlere bağlı gelişen steatoz ile ilgili araştırmalarda HCV’nin kor proteininin mikrozomal trigliserid transfer protein aktivitesini engelleyerek karaciğerin VLDL alım ve atılımını yönlendirdiği ileri sürülmüştür. Viral yük ile steatozun şiddeti arasındaki ilişki konusunda çelişkili yayınlar mevcuttur. Viral yük arttıkça steatoz şiddetlenebileceği gibi, bu viral yük ile ilişkinin saptanmadığı çalışmalar da mevcuttur (38-40).

2.2.5. HCV ve Fibrozis

Kronik Hepatit C’ye bağlı siroz gelişimi yıllarca sürebilen progresif seyirli bir süreçtir. Pek çok faktör fibrozisin ilerlemesini etkileyebilmektedir. İyi tanımlanmış faktörler; erkek cinsiyet, uzun süre ve yoğun (>50 g/gün) alkol kullanımı, tanı anında hastalık yaşı, yaş (>50), HIV ile koinfeksiyon varlığı ve şişmanlıktır (37).

Bazı çalışmalarda karaciğer histopatolojisinde steatoz varlığı ve şiddetinin fibrozisin ilerlemesini hızlandığı üzerinde durulmaktadır (37). Özellikle fibrozis varlığında viral yük de yüksek ise ($\text{HCV RNA} \geq 3 \times 10^6$ eq/ml) fibrozis skoru ve histolojik aktivite indeksi daha yüksektir (41). Şişmanlarda fibrozis ilerleme hızını etkileyen faktörlerden en önemlisi insülin direncidir. Hickman ve ark.'ı VKİ yüksek olan vakalarda insülin seviyesinin yüksek bulunmasını fibrozis ile ilişkilendirmişlerdir (42). Glukoz yüksekliğinin hastalık yaşından bağımsız olarak fibrozis skorunu arttırdığını öne süren çalışma da bulunmaktadır (43).

Hastaların bazı özellikleri ile steatozis ve fibrozis arasında ilişkinin araştırıldığı bazı çalışmalarda VKİ, visseral obezite ile ilişkinin varlığı saptanmıştır (37, 39, 40). Hastaların tanı anındaki yaşı arttıkça steatoz evresinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (39). Steatoz evresi ile fibrozis evresi arasında ve histolojik aktivite indeksi arasında korelasyon saptanmıştır (37, 39, 40). HCV'ye bağlı kronik hepatitte insüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus (DM) varlığı diğer kronik hepatitlere oranla daha sıktır. Narita ve ark.'ına göre hem insülin direnci hem de beta hücre disfonksiyonu kronik HCV hastalarındaki glukoz intoleransından sorumludur (52). Bressler ve ark.'ına göre obezite, ($\text{VKİ} > 30$) genotip ve siroz varlığından bağımsız olarak tedaviye yanıtızlık için risk faktörüdür (53). Başka bir çalışmaya göre de kilo verme (hem VKİ, hem de bel çevresi ölçümündeki gerileme) tek başına ve genotipten bağımsız olarak hem steatozu hem de fibrozisi geriletmektedir (54).



Şekil 3. HCV enfeksiyonunda apoptozisin fizyopatolojik yolakları görülmektedir (44).

HCV enfeksiyonunda insülin rezistansına neden olan steatozis, fibrozis, HCC, apoptozisin fizyopatolojik yolakları. NS3: Non strüktürel HCV protein; Core: HCV proteini çekirdeği; ROS: Reaktif oksijen radikalleri; TG: Trigliserid; LPL: Lipoprotein lipaz; SOCS3: Sitokin süpressör tip 3 sinyali; IRS -12: İnsülin reseptör substrat tip 1 ve 2.

2.2.6. Tedavi

Kronik HCV ile enfekte olan bütün hastalar tedavi için muhtemel aday olarak değerlendirilmelidir. Transaminaz düzeylerinin tedavi kararı vermede etkisi yoktur. Kronik HCV hastalarının %30'unda ALT seviyeleri sürekli olarak normal kalır. Ancak ALT'si normal olan hastalarda yapılan karaciğer biyopsilerinde %20

oranında köprüleşme fibrozisi veya siroz süreci olduğu saptanmıştır (45). Günümüzde kronik HCV enfeksiyonunun bilinen en etkili tedavisi pegile-interferon (Alfa 2a ve 2b) ile oral ribavarin kombinasyonudur.

2.3. HBV

2.3.1. Tanım ve Epidemiyoloji

Hepatit B düşük prevalanslı bölgelerde %0,1-2 arasında görülürken yüksek prevalanslı bölgelerde %10-20 arasında görülebilmektedir. Dünyada yaklaşık olarak 500 milyon HBV enfekte hasta olduğu tahmin edilmektedir. HBV enfeksiyonu; akut hepatit, inaktif taşıyıcılık, progressif kronik hepatit, karaciğer sirozu ve HCC şeklinde görülebilmektedir. Yılda yaklaşık 1 milyon insan Hepatit B virüsünün neden olduğu son dönem karaciğer yetmezliği veya HCC nedeniyle ölmektedir. Dünyada karaciğer nakillerinin %5-10'unun HBV'ye bağlı karaciğer hastalığından oluştuğu tahmin edilmektedir. HBV enfeksiyonu yüksek morbidite ve mortaliteye neden olması nedeniyle hala ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (46).

Hepatit B virüsü 3200 nükleotid uzunluğunda, yuvarlak ve kısmen çift zincirli DNA genomuna sahip non-sitopatik bir virüstür. Hepadna ailesinin üyesidir. Hepatit B virüsü sitopatik olmadığı için karaciğer hasarı hastanın virüse karşı verdiği immune yanıtı ile ilgili olarak gelişir. Virüsün temizlenmesi için hem hücresel hem de humoral yanıtın olması gerekirken hücresel immünite hastalıkta etkilenmiş kısımdır (47).

2.3.2. HBV Enfeksiyonunda Doğal Seyir

Hepatit B enfeksiyonunun 4 fazı olduğu tariflenmiştir; immün tolerans, immün klirens, inaktif taşıyıcı ve reaktivasyon. Perinatal dönemde virüsü alan hastalarda HBV DNA yükü yüksek olmasına rağmen biyokimyasal olarak aktif hepatit bulgularını göstermezler ve HBV'ye immün toleran olurlar. Farelerde yapılan bir çalışmada bunun nedeninin HBe Ag pozitifliğinin immün toleran faza girmesine neden olduğu bulunmuştur (48). Hasta immünklirens faza geçtiği zaman HBV DNA düzeyleri düşer, serum ALT düzeyleri yükselir ve hepatik histolojik aktivite artar. Bu faz uzun yıllar sürebilir. Üçüncü fazda (inaktif HBV taşıyıcılık) HBe'den Anti HBe' ye serokonversiyon olur ve HBVDNA düzeylerinde düşüş görülür bununla birlikte ALT düzeylerinde düşüş olur ve karaciğer nekroinflamasyonu çözülür. Bu faz ömür boyu sürebilen bir fazdır ancak bazı hastalarda ya spontan olarak veya immün bağımlı mekanizmalarla HBVDNA düzeylerinde yükselme olur ve HBe Ag düzeyinden bağımsız olarak serum ALT düzeylerinde yükselme ile reaktivasyon meydana gelir (49).

2.3.3. Histopatoloji

Histopatolojik olarak kronik HBV iltihabi hücre infiltrasyonu, hepatosit ölümü, atrofi, rejenerasyon ve fibrozisin bir kombinasyonudur (64). Etiyolojide rol alan faktörlerin belirlenemediği dönemlerde tüm kronik hepatitler yalnız morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflamaya göre kronik hepatitler, kronik lobüler hepatit, kronik persistan hepatit, kronik aktif hepatit olarak sınıflandırılmıştır (65, 66).

Kronik Viral hepatitlerde görülen temel lezyonlar

a) Portal inflamasyon: Akut hepatit olgularına göre daha yoğun mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu bulunmaktadır. Çoğunluğu CD4+ T helper lenfositler oluşturmaktadır, arada plazma hücreleri mevcuttur (50).

b) İnterfaz hepatit: Portal iltihap ile birlikte ve portal mesafelerin bağ dokusu sınırındadır. Parankim ile portal alana ait bağ doku sınırında tek tek veya grup halindeki hepatositlerin kronik, ilerleyici hasarı ve beraberinde lenfositik iltihabi infiltrasyon olarak tanımlanabilir. İnterfaz hepatiti sonucunda hepatositlerde şişme, büzüşme veya sitoplazmik parçalanmayla ortaya çıkan bütünlük kaybı (apoptozis) gibi gelişmelerin söz konusu olduğu dejeneratif değişiklikler gösterir (51). İnterfaz hepatiti hafif, orta veya şiddetli olabilir. Çoğunluğunu CD8+ supressör T lenfositleri oluşturmaktadır (50).

c) Lobüler hepatit ve konfluent nekroz; Çok sayıda farklı alanda, özellikle santral vene yakın yerleşim gösteren ve fokal nekrozlardan daha çok sayıda hepatositi etkileyen nekrozdur. Konfluent nekrozlar portal ve santral yapılar arasında birleşmeler yaparak vasküler yapıları bağlayan köprüleşme (bridging) nekrozları geliştirir (52).

d) Fibrozis: Kronik hepatit olgularında skar veya bağ dokusu artışı öncelikle portal stromanın artışı ile meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra perivenüler ve perisellüler bağ doku artışı da olabilmektedir. Bu skar dokusu santral ven ile komşu portal alan arasında veya bir başka santral vene doğru uzanarak devamlık kazanabilir (53).

2.3.4. Klinik Özellikler ve Tanı

Akut infeksiyon sonrası 6 aydan uzun süreli HBsAg pozitifliği kronik HBV'nin göstergesidir. Bu durumda viral replikasyon karaciğerde devam eder ve hem karaciğer hem de kanda titresi değişmekle birlikte viremi devam eder. Hastaların çoğu asemptomatiktir. Birçok hastanın ileri evre kronik karaciğer hastası veya HCC olarak teşhis edilmesi hastalığın sinsi ve ilerleyici yapısından kaynaklanır (54).

Serolojik tanı, HBV infeksiyonunun spesifik tanısı virüse ait antijen ve antikorların serolojik yöntemlerle saptanmasına dayanır. Bu amaçla HBsAg, HBeAg, anti-HBs, antiHBe, antiHBc IgM, antiHB IgG serolojik olarak saptanabilirken, HBcAg ise sadece hepatositlerde bulunduğu için saptanamaz (69). Serolojik testler akut ve kronik HBV infeksiyonunun ayrılmasında, infektivite değerlendirilmesinde, immünite araştırılmasında ve donör taramasında kullanılır (55).

2.3.5. Tedavi

Tedavinin primer hedefi HBV DNA düzeyinin karaciğer hastalığı ile ilişkili düzeyin altına gelecek kadar süprese edilmesi. Bu hedef ya interferon veya nukleozid analogları ile sağlanabilir. HBe Ag pozitif kronik hepatit B hastaları için HBV DNA'nın 10^5 kopya/ml (<20.000 IU/ml) ve bu düzeyden daha düşük düzeylerde kronik HBe Ag negative hastalar için sağlanmaya çalışılmaktadır. Tedavide en önemli amaç tedavi almaksızın HBV DNA düzeylerinin süprese olarak kalmasını sağlamaktır. HBeAg serokonversiyonu da tedavide sonlanım

noktalarından biridir (56). Tedavi endikasyonları serum HBV DNA seviyeleri, serum aminotransferaz seviyeleri ve histolojik grade ve stage durumuna göre belirlenir. HBV DNA seviyeleri 2000 IU/ml (10000 kopya/ml) ve/veya ALT değerleri normalin üst sınırının üzerindeyse ve karaciğer biyopsisinde orta veya ciddi nekroinflamasyon ve/veya fibrozisin varlığı tedavi endikasyonlarından (57). Tedavide ayrıca hastanın yaşı, performansı, ülkelerin antiviral ajanlara ulaşılabilirlik durumları da dikkate alınmalıdır.

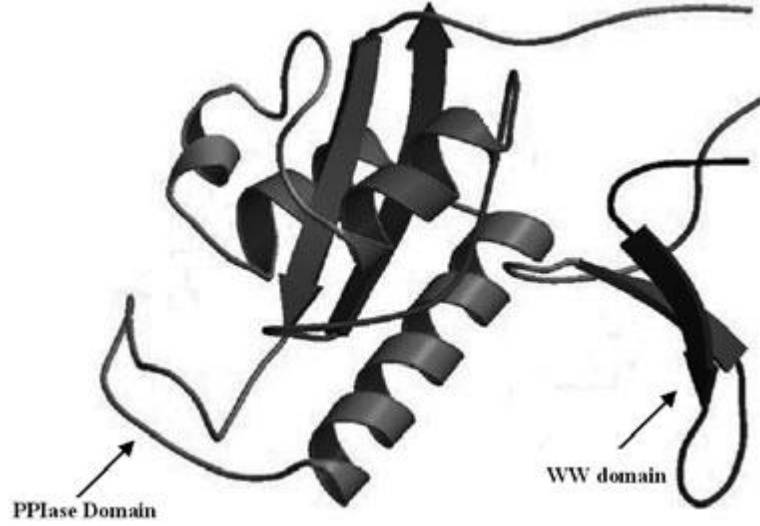
2.3.6. HBV ve Steatoz

Kronik HBV'de steatoz prevalansı ile ilgili az sayıda çalışma olmakla birlikte bu hasta grubunda steatoz prevalansı genel popülasyonla benzer bulunmuştur. Steatozun varlığı, metabolik sendrom tanı kriterleri ve VKI ile korele bulunurken, viral genotip ve viral yük ile ilişkili bulunmamış ve hatta steatozun fibrozis ile de ilişkisi bulunmamıştır (6).

2.4. PIN-1 Protein

Pin1 proteini, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1, PIN1 geni tarafından kodlanmaktadır. Bazı organizmalarda hücre bölünmesinde görev almaktadır. Ayrıca normal hücrenin bazı hayati fonksiyonlarında yer almaktadır. Pin proteini 18 kDa büyüklüğünde, hücresel lokalizasyonu olmayan ve sinyalizasyonu bulunmayan bir proteindir. Ekspresyonu normalde hücre proliferasyonu ve hücre yaşamı ile ilişkilidir. Pin1 proteini PPIaz ve WW adlı 2 bölümü bulunan bir proteindir. PPIaz bölümü karboksi terminalden oluşmakta ve izomerizasyondan sorumluyken, WW bölümü amino terminalinden oluşur ve

pSER ve THR pro motiflerine bağlanan kısımdır. WW kısmı birçok hidrofik izolösin, valin tirozin ve/veya fenilalanin veya arjinin ile lizin rezidüleri tarafından çevrilmiştir (58, 59).



Şekil 4. Pin1 protein yapısı

Pin1 proteinin enzimatik aktivitesi iki basamaklı bir süreç olarak işlemektedir. WW kısmı Pin1'in hedef moleküle bağlanmasını sağlarken, PPIaz kısım ise substratın yapısında izomerizasyona neden olur (58, 60).

Proteinler içerisinde bulunan prolin residüelleri cis ve trans yapısal bağlarından oluşur ve prolyly cis-trans isomeraz (PPIases) intrinsic yapısal değişiklikleri kontrol eder. PPIasesler 4 gruba ayrılır; siklofilinler, FK506-bağlayıcı proteinler, parvulinler ve yeni tanımlanan PP2A aktivatörü PTPA (61-64). Parvulinler PIN-1 ve Pin-4 oluşmaktadır ve NIMA kinaz ile etkileşime girmektedir (5). Pin-1 fosforile olan Cdc 25'i inhibe etmekle beraber protein stabilitesini ve tümör süpresör geni p53'ü kontrol ederek hücre siklusunun progresyonunda görev alır (65, 66). Pin 1 T cell ve eozinofilleri aktive ederek sitokin ekspresyonunda görev almakla birlikte hem in vitro hem de invivo olarak T cell ve eozinofil apoptozunda görev almaktadır (67).

Ayrıca Pin-1 blokajının, transforming growth factor β 1 (TGF β 1) ve granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) üretimini azalttığı ve ayrıca deneysel düzeyde inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (68,69). Farelerde yapılan bir çalışmada Pin1 blokajı yapan Juglone adlı molekülün böbrek fibrozisini azalttığı gösterilmiştir (12).

Gerçekte Pin-1 düzeyi birçok kanserde artmakla beraber malign transformasyonda yer almaktadır ayrıca Pin-1 beyinde ve immün yanıtta kritik rol almaktadır (70-75). Pin-1 Crtc 2'ye bağlanarak karaciğerde cAMP'in transkripsiyonel ve glukojenik aktivitesini baskılar (76). Ayrıca Pin-1 ana insülin reseptör substratı olan IRS-1 ile ilişkiye girerek insülin bağımlı metabolik olayları artırır (77). Pin-1 pre-adipositlerin matür adipositlere dönüşümünde yer almaktadır ancak bunun mekanizması henüz bilinmemektedir. Pin-1'in beslenmedeki görevi düşünüldüğünde besin durumu da göze alındığında fizyolojik olarak faydalı olabileceği sonucu çıkmaktadır (77). Pin-1 ayrıca inflamatuvar süreçte görev alan NF-kB and IRAK1 gibi sitokinlerin aktivasyonunda da görev almaktadır (78-81).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastalar

Bu prospektif klinik çalışmaya Ocak 2010–Temmuz 2013 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji bölümü tarafından takip edilen hastalar alınmıştır.

Kronik HCV enfeksiyonu tanısı, anti HCV pozitif, HCV-RNA pozitifliği ve uygun histopatolojik lezyonların varlığının gösterilmesi ile konuldu

Kronik HBV tanısı, HbsAg, antiHBs, antiHBc IgG, HbeAg, AntiHBe, HBV DNA, AST, ALT testleri yapılarak ve uygun histopatolojik lezyonların varlığının gösterilmesi ile konuldu. Kronik hepatit B hastaları HbeAg negatif hastalar arasından seçildi. Altı aydan uzun süren HbsAg pozitifliği, HbeAg negatifliği, antiHbe pozitifliği olan, serumda HBV DNA $\geq 10^6$ kopya/ml olan hastalara HbeAg negatif kronik hepatit B tanısı konuldu.

NASH hastalığı tanısı ise, altı aydan uzun süren karaciğer enzim yüksekliği nedeniyle yapılan abdominal ultrasonografik görüntülemelerde en az grade 1 steatoz varlığının gösterilmesi ve karaciğer biyopsisi yapılarak doğrulandı. NASH dışındaki karaciğer hastalıklarının ekarte edilmesi için viral hepatit belirteçleri (Anti HAV IgM, AntiHAV IgG, HbsAg, antiHBs, antiHBc Igm, antiHBc IgG, HbeAg, AntiHBe, anti HCV), otoimmün belirteçler, metabolik hastalık parametreleri (serüloplazmin, demir, demir bağlama kapasitesi, ferritin, alfa-1 antitripsin), TSH bakıldı.

Kronik HBV-HCV ve NASH için çalışmaya alınma kriterleri;

- Daha önce bu hastalıklar için tedavi almamış olmak
- 18-100 yaş aralığında olmak
- Ciddi alkol kullanım hikayesinin olmaması
- Birlikte ciddi komorbid kronik hastalıklarının (malignite, kronik böbrek hastalıkları, KOAH, HIV, konjestif kalp yetmezliği, otoimmün hastalıklar, vs.) olmaması
- Sürekli ilaç alım öyküsünün (östrojen, kortikosteroid, amiodarone, lipid düşürücü ajan vs.) olmaması

Kronik HBV-HCV ve NASH için çalışmanın dışlama kriterleri

- HBV ve konkomitant HBV + HCV enfeksiyonu
- Anti HDV pozitifliği
- HIV pozitifliği
- HbeAg pozitif kronik hepatit B hastaları
- Otoimmün karaciğer hastalığı
- Yetersiz karaciğer örnekleri içeren biyopsi materyali
- Dekompanze kronik karaciğer hastalığı bulguları olması (asit veya asit öyküsü, varis kanaması öyküsü, hepatik ensefalopati, karaciğer yetmezliğine bağlı sarılık öyküsü)
- Kontrolsüz DM öyküsünün olması

Tüm hastalardan standart protokole göre hikaye alındı ve fizik muayene yapıldı. Hastaların demografik bilgileri kaydedildi. Hikayede alkol kullanımı ve ilaç öyküsü sorgulandı. Tüm hastalardan karaciğer biyopsisi yapıldığı gün

yaklaşık 8-12 saatlik açlık sonrası eş zamanlı sabah alınan kandan ayrılan serumda AKŞ, açlık insülin, total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid, VLDL, AST, ALT, ALP, GGT, Pın1 düzeyleri için kan alındı. Karaciğer biyopsisi yapıldığı güne ait boy ve kiloları kaydedilerek VKİ (kg/m^2) değerleri hesaplandı.

Kontrol grubunu, herhangi bir kronik hastalığı olmayan, sürekli ilaç kullanım öyküsü olmayan gönüllüler oluşturdu. Kontrol grubu HbsAg ve anti HCV negatif, günlük alkol tüketimi 20 g/gün altında olan, karaciğer fonksiyon testleri ve ultrasonografi bulguları normal olan bireylerden oluşuyordu.

3.2. Serum PIN-1 Düzeyinin Ölçülmesi

Çalışma sırasında daha önce ayrılan serum örneklerinde PIN 1 düzeyi ticari olarak mevcut olan bir enzim bağlı immünosorbant asey (ELISA) kiti (Human Protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1 (PIN 1) ELISA kit; CUSABIO, Wuhan Hi-tech Medical Devices Park, Building B11, #818 Gaoxin Road, Donghu Hi-Tech Development Area, Wuhan, Hubei Province 430206, P.R.China, katalog numarası: CSB-E11308h) ile üretici firma talimatları doğrultusunda aşağıda anlatıldığı şekilde çalışıldı:

Kullanılan ticari PIN1 ELISA kiti, bir kantitatif sandviç enzim immunoaseydir. Kit içerisinde bulunan mikropalak PIN1'a özgül bir antikorla önceden kaplanmıştır. Kullanılan ELISA kitinin insan serumunda PIN1 ölçümü için sensitivitesi ($<0,39 \text{ pg/ml}$) ve spesifisitesi son derece yüksektir; PIN1 ile başka analogları arasında anlamlı çapraz-reaktivite veya interferans

gözlenmemiştir. Intra-asey doğruluğu CV%<8 ve inter-asey doğruluğu CV%<10 olarak bildirilmiştir. Kitin ölçüm aralığı 1,56-100 pg/ml'dir.

Çalışma başlamadan önce tüm serum örneklerinin oda sıcaklığında çözülmesi beklendi, sonra her örnek 15 saniye vortekslenerek homojenize edildi. Çalışma başlamadan 30 dakika önce kullanılacak ELISA kitinin tüm içeriğinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.

Çalışmaya başlamadan önce tüm çalışma çözeltileri uygun şekilde hazırlandı:

Kit içerisinde "100X biotinle işaretlenmiş anti-PIN1 antikoru" bulunuyordu, vial açılmadan önce vortekslenerek homojenize edildi; her 10 µl antikora 990 µl biotin-antikor çözücüsü (*diluent*) eklenerek "1X biotinle işaretlenmiş anti-PIN1 antikoru" elde edildi ve çalışmada kullanıldı.

Kit içerisinde "100X avidin-işaretli HRP" bulunuyordu, vial açılmadan önce vortekslenerek homojenize edildi; her 10 µl antikora 990 µl HRP-avidin çözücüsü (*diluent*) eklenerek "1X avidin-işaretli HRP" elde edildi ve çalışmada kullanıldı.

Otomatik ELISA yıkayıcısında kullanılacak olan 1X yıkama tampon çözeltisi (*Wash buffer*) hazırlamak için kitle birlikte sağlanan 25X yıkama tampon çözeltisinin içindeki kristaller tamamen çözününceye kadar yavaşça karıştırıldı, daha sonra 20 ml 25X yıkama tampon çözeltisine 480 ml deyonize distile su eklenerek 1X yıkama tampon çözeltisi hazırlandı ve çalışmada kullanıldı.

Kit içeriğinde sağlanan standard viali kullanılmadan önce 30 saniye vortekslendi, daha sonra 1,0 ml örnek çözücü (*sample diluent*) eklenerek sıvı hale

getirildi, tekrar 15 saniye vortekslenerek homojenize olması sağlandı. Hazırlanan stok standardın (S7) final konsantrasyonu 100 pg/ml idi. 6 tane 10 ml'lik polipropilen tüp alındı, her birine 250 µl örnek çözücü eklendi, hazırlanmış stok standarttan 1.tüpe (S6) 250 µl aktarıldı (konsantrasyon 50 pg/ml), mikropipetle homojenize edildikten sonra 1.tüpten 2.tüpe (S5) 250 µl aktarıldı ve böyle devam edildi: Böylece 2. tüpün (S5) konsantrasyonu 25 pg/ml; 3.tüpün (S4) konsantrasyonu 12,5 pg/ml; 4.tüpün (S3) konsantrasyonu 6,25 pg/ml; 4.tüpün (S2) konsantrasyonu 3,12 pg/ml ve 5.tüpün (S1) konsantrasyonu 1,56 pg/ml oldu. 6.tüpe (S0) aktarım yapılmadı, sadece örnek çözücü içerdiği için boş/kör (*blank*) olarak kullanıldı ve PIN1 konsantrasyonu 0 pg/ml olarak kabul edildi.

Çalışma Basamakları:

1. İçlerindeki PIN1 miktarı bilinen standartlar ve örnekler uygun kuyucuklara mikropipetle 100 µl/kuyucuk aktarıldı. Mikroplaktaki 1. Strip standartlar için kullanıldı: A1'e S6'dan, B1'e S5'ten, C1'e S4'ten, D1'e S3'ten, E1'e S2'den, F1'e S1'den, G1'e S1'den ve H1'e ise S0'dan (blank) 100 µl/kuyucuk aktarıldı.

2. Mikroplağın üzeri kit içerisinde sağlanan yapışkanlı strip ile kapatıldıktan sonra %5 CO₂'li, su ceketli enkübatörde 37°C'da 2 saat enkübe edildi. Bu süre zarfında standartların ve örneklerin içerisinde bulunan PIN1 mikroplağı kaplayan anti-PIN1 antikorlara bağlandı.

3. Enkübasyondan sonra yıkama yapılmayarak kuyucuklardaki sıvılar aspire edildi ve her kuyucuğa 100 µl 1X biotinle işaretlenmiş anti-PIN1 antikor ilave edildi.

4. Enkübatorde aynı şekilde 37°C’da 1 saat enkübe edildi.
5. Kuyucukların içeriği aspire edildikten sonra otomatik ELISA yıkayıcısı ile 200µl/kuyucuk şeklinde yapılan ayarlama ile 1X yıkama tampon çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı. Son yıkamadan sonra mikrolak ters çevrilip kurutucu kağıt havlular üzerine çırpılarak içerisinde hiç sıvı kalmaması sağlandı
6. Yıkama sonrası, sinyalizasyonu artırmak için 1X “avidin işaretli Horseradish Peroxidase (HRP) enzimi” kuyucuklara eklendi ve mikrolağın üzeri yapışkanlı strip ile kapandı.
7. Yine 37°C’da 1 saat enkübasyon yapıldı.
8. Enkübasyon sonrası yukarıda anlatıldığı ekilde ancak 5 kez yıkama yapıldı.
9. Daha sonra her kuyucuğa 90µl of TMB Substratı eklendi.
10. Mikrolak ışıktan korunarak 37°C’da 15-30 dakika enkübe edildi.
11. Renk değişimi gözlenen plakta reaksiyon 50µl/kuyucuk Stop (durdurma) Solüsyonu eklenerek durduruldu, bu esnadan mikrolağın kenarına hafifçe parmakla vurularak stop solüsyonunun kuyucuklarda iyice karışması sağlandı.
12. Reaksiyon durdurulduktan sonra 5 dakika içerisinde, mikrolak kuyucuklarında oluşan renk değişimi otomatik ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda (referans filter 540 nm dalga boyunda olmak üzere) spektrofotometrik olarak değerlendirildi ve her kuyucuğa ait optik dansiteler (OD) ölçüldü.

13. Konsantrasyonları bilinen standartlara ait kuyucukların OD değerlerinden yararlanarak, Microsta isimli bilgisayar tabanlı bir istatistik programı kullanılarak, regresyon-korelasyon analizi yapılarak örneklerin OD değerlerinden PIN1 konsantrasyonları hesaplandı. Bu hesaplamalarda H1 kuyucuğundaki S1 (blank) konsantrasyonu 0 (sıfır) olarak alındı.

3.3. Karaciğer Biyopsilerinin Değerlendirilmesi

Karaciğer biyopsisi, hastalara 16 gauge Hepafix iğne kullanılarak, gece açlığını takiben lokal sedasyon verilerek ultrasonografi eşliğinde tecrübeli klinisyen tarafından yapıldı. Biyopsi örneklerinde en az 12 adet portal alan içeren ve en az 15mm uzunlukta olan örnekler çalışmaya dahil edildi ve bağımsız tecrübeli tek bir hepatopatolog tarafından değerlendirildi. Tüm biyopsi örnekleri fiksasyon amacıyla formalinli solusyona alındı ve parafin bloklara gömüldü. Seri kesitler (4mm aralıklarla) kesilerek Hematoksilen Eozin (H&E) ve Masson Trikrom ile boyandı.

Tüm NASH olan hastaların karaciğer biyopsileri Brunt skorlama sistemi kullanılarak skorlandı.

NASH'ta NAFLD aktivite skoru (NAS) skorlaması

Steatoz skoru:

- 0: <5%(normal)
- 1: 5-33%(hafif)
- 2: >33-66%(orta)
- 3: >66%(şiddetli)

İnflamasyon skoru

- 0: yok
- 1: < 2 foci/HPF
- 2: 2-4 foci/HPF
- 3: > 4 foci/HPF

Balonlaşma skoru

- 0: yok
- 1: az
- 2: çok or önemli düzeyde

toplamda 0-8 arasında değişmektedir. NAS skoru 0-2 olan hastalar basit steatoz, 3-4 olanlar sınırda steatohepatit ve NAS skoru ≥ 5 olan hastalar kesin steatohepatit olarak kabul edildi (82). Fibrozis evrelemesi Brunt skorlamasına göre;

- 0 = fibrozis yok
- 1: Zone 3 perisinuzoidal fibrozis
- 2: Zone 3 perisinuzoidal fibrosis ve periportal fibrozis
- 3: Köprüleşme fibrozisi
- 4: Siroz olarak değerlendirildi (83).

Kronik HBV-HCV ile infekte hastalarda karaciğer biyopsilerinin değerlendirilmesinde Ishak skorlama sistemi kullanıldı (84). Buna göre nekroinflamatuvar aktivite skoru (NIA) 0-18 (portal inflamasyon 0-4, interfaz hepatiti:0-4, konfluen nekroz:0-6, fokal nekroz:0-4) ve fibrozis skoru 0-6 olacak şekilde bağımsız bir patolog tarafından değerlendirildi.

Hem kronik viral hepatitlerde hem de NASH hastalarında hepatik steatozun derecelendirilmesi yağ damlacıkları içeren hepatosit yüzdesine göre değerlendirildi. Buna göre; grade 0: < %5 steatoz, grade 1: hafif %5-33, grade 2: orta %33-66, grade 3: ciddi > %66 olarak kabul edildi.

3.4. Etik Kurul

Çalışmaya katılan bütün hastalara ve sağlıklı kontrollere çalışma hakkında detaylı bilgi verildi ve bilgilendirilmiş onam formu imzalatıldı. Çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kuruluna başvurularak 24.06.2013 tarihli toplantıda 12 karar numarası ile onay alındı.

3.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 18 yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı analizler normal dağılmayan ve ordinal değişkenler için frekans tabloları kullanılarak verildi. Serum Pin-1 düzeylerinin normal dağılım göstermemesi nedeniyle gruplara arasında karşılaştırmak için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İkişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak değerlendirildi. Dört grup arasında yapılan karşılaştırmalarda $p < 0,0125$ anlamlı olarak kabul edildi. Her iki değişken de normal dağıldığında korelasyon katsayısı ve istatistiksel anlamlılıklar Pearson testi ile hesaplandı. En az biri normal dağılmayan ya da ordinal olan değişkenler arası ilişkiler için korelasyon katsayıları ve istatistiksel anlamlılıklar Spearman

testi ile hesaplandı. NASH hastalarında ileri fibrosis varlığını tahmin etmede univariate analizde anlamlı çıkan faktörler sonrasında multivariate analize alındı ve faktörlerin bağımsız risk faktörü olup olamayacakları analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık için tip-1 hata düzeyi %5 olarak alındı.

4. BULGULAR

İçleme ve dışlama kriterlerine uygun olan 55 NASH, 66 kronik HCV, 28 Kronik HBV hastası ve 29 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 178 vaka alındı. Sırasıyla NASH hastalarının %60'ı, kronik HCV hastalarının %62,1'i, kronik HBV hastalarının %40'ı ve kontrol grubunun %68'i kadın cinsiyetti ve ccinsiyet açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu $P = 0,12$. Gruplarının VKI'leri karşılaştırıldığında NASH, HCV, HBV ve kontrol gruplarında sırasıyla $30,07 \pm 4,28$, $27,1 \pm 3,99$, $26,21 \pm 2,85$, $26,67 \pm 4,51$ olarak bulundu ve $P < 0,001$ olarak tespit edildi. Grupların yaş ortanca değerleri sırasıyla 50 (25-71), 56 (34-75), 46 (21-72), 43 (25-69) olarak bulundu ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı $P < 0,001$. Hasta grupları ve kontrol grubunun demografik özelliklerinin karşılaştırılması Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarının demografik/klinik özelliklerinin karşılaştırılması

Değişkenler	NASH (N=55)	HCV (N=66)	HBV (N=28)	Kontrol (N=29)	P
Cinsiyet E/K	22/33	25/41	17/11	9/20	0,12
yaş	50 (25-71)	56 (34-75)	46 (21-72)	43 (25-69)	<0,001
bmi	$30,07 \pm 4,28$	$27,1 \pm 3,99$	$26,21 \pm 2,85$	$26,67 \pm 4,51$	<0,001

Hasta gruplarının ve kontrol grubunun karaciğer enzim düzeyleri karşılaştırıldığında ALT, AST ve GGT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken $P < 0,001$, ALP değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı $P = 0,083$. Ayrıca hasta grupları ve kontrol grubu arasında kan değerleri karşılaştırıldığında Hb, trombosit sayısı ve

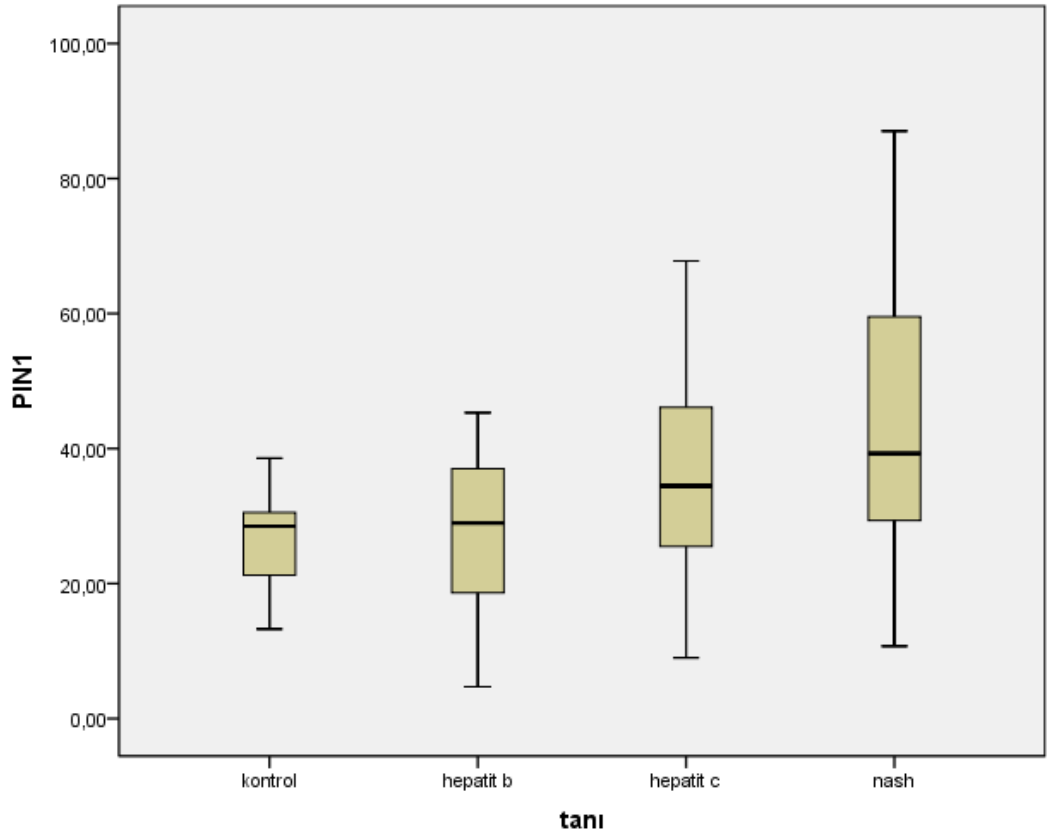
beyaz küre sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel farklılık olduğu bulundu her üç parameter için $P < 0,001$ olarak hesaplandı. Serum Pin-1 düzeylerinin kontrol grubunda diğer üç gruptan düşük olduğu bulundu. Serum Pin-1 protein düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında NASH grubunda $43,56 \pm 20,88$, HCV grubunda $35,72 \pm 14,33$, HBV grubunda $27,79 \pm 11,69$ ve kontrol grubunda $27,11 \pm 7,07$ bulundu ve istatistiksel anlamlı fark olduğu tespit edildi $P < 0,001$. Bonferroni düzeltilmesi ile ikili gruplar karşılaştırıldığında; HBV-kontrol gruplarında $P = 0,64$, kontrol-HCV grupları arasında $P = 0,003$, kontrol-NASH grupları $P < 0,001$, HBV-HCV arasında $P = 0,017$, HBV-NASH arasında $P < 0,001$ ve HCV-NASH grupları arasında da $P = 0,05$ olarak bulundu. Gruplar arasında karaciğer enzim düzeyleri, kan değerleri ve serum Pin-1 düzeylerinin karşılaştırılmaları Tablo 2’de gösterilmektedir.

Tablo 2. Hasta ve kontrol gruplarının serum Pin-1 ve kan değerlerinin karşılaştırılması

Değişkenler	NASH(N=55)	HCV (N=66)	HBV (N=28)	Kontrol (N=29)	P
Pin1	$43,56 \pm 20,88$	$35,72 \pm 14,33$	$27,79 \pm 11,69$	$27,11 \pm 7,07$	$<0,001$
Hemoglobin	$13,94 \pm 1,62$	$13,05 \pm 1,61$	$14,85 \pm 1,71$	$14,18 \pm 1,32$	$<0,001$
Trombosit	$232,87 \pm 77,98$	$188,76 \pm 75,23$	$200,214 \pm 42,41$	$239,42 \pm 65,80$	$<0,001$
Beyaz küre	$7458,56 \pm 2183$	$5929,68 \pm 2325$	6581 ± 1831	6766 ± 2406	$<0,001$
ALT	$60,79 \pm 56,97$	$47,83 \pm 31,2$	$35,32 \pm 25,85$	$20,86 \pm 7,34$	$<0,001$
AST	$55,7 \pm 42,51$	$48,38 \pm 42,39$	$32,64 \pm 22,80$	$20,39 \pm 5,23$	$<0,001$
ALP	$106,24 \pm 67,26$	$104,14 \pm 62,25$	$81,14 \pm 22,02$	$82,75 \pm 34,93$	$0,083$
GGT	$79,94 \pm 71,8$	$64,35 \pm 44,5$	$26,9 \pm 18,52$	29 ± 28	$<0,001$

Bonferroni düzeltmesine göre $P < 0,0125$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Serum Pin 1 düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. Hasta ve kontrol gruplarının serum Pin-1 düzeylerinin karşılaştırılması

Kronik hepatit grupları, NASH ve kontrol gruplarının lipid profil düzeyleri karşılaştırıldığında kronik hepatit gruplarında değerler düşük olmasına karşın NASH hastalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulundu $P < 0,01$ Ancak HDL düzeyleri arasında istatistiksel fark olmadığı tespit edildi $P = 0,08$. Grupların lipid profil değerlerinin karşılaştırılması Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Gruplar arasında lipid profillerinin karşılaştırılması

Değişkenler	NASH	HCV	HBV	Kontrol	P
Total kolesterol	197,97±39,82	171,76±47,37	169,66±32,39	201,84±36,13	0,002
HDL	43,50± 10,24	50,78± 26,39	41,52± 8,74	48,23± 9,29	0,082
LDL	120,79±29,64	95,89± 43,62	105,67±26,93	121,20±29,84	0,001
VLDL	33,25 ±15,47	25,38± 11,40	21,88± 11,93	28,72 ±16,53	0,03
TG	171,18± 76,22	128,93± 70,70	109,95± 59,42	147,77± 79,52	< 0,001

Serum Pin-1 düzeylerinin NASH grubunda NAS skoru, steatozis, lobüler inflamasyon, balonlaşma ve fibrozis skorlarıyla ilişkileri araştırıldığında sırasıyla $P < 0,01$, $P < 0,01$, $P = 0,02$, $P < 0,01$ ve $P < 0,01$ olarak tespit edildi ve tümüyle istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu görüldü. Pin-1 düzeyi ile NASH hastalarının histopatolojik özellikleri arasındaki ilişkiler Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 4. NASH hastalarında serum Pin-1 düzeyi ile histopatolojik özellikler arasındaki ilişkiler

Değişkenler	r^*	P
NAS	0,382	< 0,01
Steatoz	0,707	< 0,01
Lobüler inflamasyon	0,314	< 0,01
Balonlaşma	0,364	< 0,01
Fibrotik skor	0,511	< 0,01

* r değeri: spearman korelasyon katsayısı; NAS: nonakolik yağlı karaciğer aktivite skoru

Kronik HCV ve HBV hastalarında nekroinflamatuvar aktivite indeksleri ve fibrotik skorların hastaların serum Pin-1 düzeyleri ile ilişkileri araştırıldığında hem NIA hem de fibrozis skorlarıyla ilişkili olduğu görüldü. Serum Pin-1 düzeyleri ile kronik hepatitlerin histopatolojik özellikleri ile ilişkisi Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5. HCV-HBV hastalarının histolojik özellikleriyle serum Pin1 düzeyi arasındaki ilişki

Değişkenler		HCV	HBV
NIA	r*	0,506	0,312
	P	< 0,01	< 0,01
FE	r	0,438	0,310
	P	< 0,01	< 0,01

*r: Spearman korelasyon katsayısı; NIA: nekroinflamatuvar aktivite; FE: fibrotik evre

NASH hastalarında fibrozis gruplarına göre hastalar hafif derecede fibrozis olanlar, fibrozis skorları 0 ve 1 olanların sayısı (n=33) ve ileri fibrozisi olan hastalar yani fibrozis skorları 2-4 olan hastalar gruplandırılıp istatistiksel analizler yapıldığında sırasıyla $34,92 \pm 17,92$, $56,53 \pm 18,40$ $P < 0,01$ ve heriki grup arasında istatistiksel anlamlı fark olduğu tespit edildi.

NASH hastalarında ileri fibrozisin tahmin edilebilirliği araştırıldığında univariate lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan trombosit sayısı, serum Pin-1 protein düzeyi ayrıca fibroziste etkili olabilecek cinsiyet ve yaş faktörleri multivariate analize ile değerlendirildiğinde Pin-1 düzeyinin tek başına fibrozisi

tahmin etmede bağımsız faktör olabileceği istatistiksel olarak görüldü OR: 1,051, CI %95 (1,013-1,090) $P < 0,01$. Fibrozisi tahmin etmede bağımsız değişken olma ihtimalleri yönünden Univariate ve Multivariate analiz sonuçları Tablo 6 ve Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 6. NASH hastalarında ileri fibrois için Univariate analiz sonuçları

Değişkenler	OR	CI %95	P
PIN1	1,063	1,026-1,101	0,001
Trombosit	0,991	0,982-0,999	0,028
INR	2,1	-	0,012
Yaş	0,044	0,988-1,126	0,109
ALT	0,602	0,992-1,011	0,77
AST	0,516	0,994-1,016	0,401

OR: odds ratio; CI: %95 güvenirlilik aralığı

Tablo 7. NASH hastalarında ileri fibrozis için Multivariate analiz sonuçları

Değişkenler	OR	CI %95	P
Pin1	1,052	(1,014-1,091)	0,008
Trombosit	1	(0,989-1,010)	0,94
INR	-	(0,756-8,2)	0,63
yaş	1,051	(0,969-1,140)	0,23

OR: odds ratio; CI: %95 güvenirlilik aralığı

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada iyi tariflenmiş NASH, kronik HCV, kronik HBV ve sağlıklı kontrol gruplarında serum Pin-1 protein düzeyleri karşılaştırıldı ve bu protein düzeylerinin ayrıca hasta gruplarının histopatolojik özellikleriyle ilişkileri araştırıldı. Serum Pin-1 protein düzeyleri NASH grubunda daha yüksek olmakla birlikte kronik HCV grubunda da yüksek bulundu. Literatürle uyumlu olarak kronik HBV ile kontrol grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı. NASH hastalarında steatozisin fazla olması nispeten kronik HCV hastalarında da steatozis bulunması nedeniyle serum Pin-1 düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Ancak kronik HBV ile infekte olan hastalarda serum Pin-1 değerleri sağlıklı kontrollerle bile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark olmaması özellikle HBV'li hastalarda tanı anında steatozisin normal toplumla benzer görülmesi sonucunu teyid etmekle beraber serum Pin-1 düzeyinin ayrıca bu özellikli hasta gruplarında steatozis varlığını göstermede iyi bir belirteç olarak görülmektedir. NASH gelişmesi için makrofaj varlığına ihtiyaç bulunmaktadır ayrıca TNF a'nın da salınması gerekmektedir. Nakatsu ve ark.'larının farelerde yaptığı deneysel bir çalışmada NASH oluşturulan farelerde makrofaj aktivitesinin ana kaynakları olan TNF α ve MCP-1 düzeylerinin Pin-1 düzeyi açısından knock out olan farelerde tamamen yok olduklarını tespit edilmiştir. Ayrıca moleküler düzeyde bakılan TNF α ve MCP-1 düzeylerinin Pin-1 varlığıyla ters ilişkili olduğunu bulmuşlardır (76). Değişik bazı çalışmalarda sitokinler üzerinden gelişen inflamasyonda Pin-1 molekülün rolü üzerinde durulmuş ve oksidatif strese bağlı olarak Pin-1 düzeyinin artışının inflamasyona ve hücresel düzeyde

fonksiyon bozukluğuna neden olduğu tespit edilmiştir (8, 85, 86). Bunun üzerine değişik metodlarla bu oksidatif stresi azaltmak ve inflamasyonun progresyonda etkili olduğu bazı hastalıkların belki de ilerlemesinin durdurulmasında Pin-1 inhibitörlerinin yeri ile ilgili deneysel düzeyde çalışmalar mevcuttur (9). Pin-1 proteinin karaciğer yağlanması neden olması 4 ayrı mekanizmayla açıklanmaya çalışılmıştır. Birincisi, fare karaciğerlerinde Pin-1 proteini PPR α yolağıyla ile kontrol edilen lipolitik genlerin aktivitesini düşürür (87). İkincisi, Pin-1 proteini insulin yolağı üzerinden lipid sentezine neden olan IRS-1 düzeyinin artışına neden olur ve lipid sentezine arttırır (77). Üçüncüsü Pin-1, AMPK yolağını süprese eder ve lipoliziste düşüşe neden olur (88). Son olarak da Crtc2 ile ilişkiye girerek insulin duyarlılığını arttıran CRE transkripsiyon aktivitesini süprese eder (89). Bu yollarla Pin-1 karaciğerde yağlanmaya neden olmaktadır ve hastalığın progresyonunda yer almaktadır.

Bu çalışmada Pin-1 proteinin sadece steatozla ilişkili olmadığı ayrıca NASH, kronik HCV ve HBV hastalarında fibrozisle de ilişkili olduğu sonucuna vardık. Ayrıca fibrozis skorlarının artışına paralel olarak hastalarda serum Pin-1 protein düzeylerinde artış olduğunu tespit ettik. Yaptığımız ileri analizler sonucunda Pin-1 proteinin hastalığın progresyonunu gösteren ileri fibrozis üzerinde de bağımsız bir risk faktörü olduğu tespit edildi. Bu sonuçla birlikte birçok sitokin ve oksaditif stresin yer aldığı karışık ve kompleks fibrozis yolunda Pin-1 proteinin fizyopatogeneizde rolü olduğunu gördük. Serum Pin-1 proteinin aktivitesinin engellendiği durumlarda belki de fibrozis oluşumu yavaşlayacak hatta geri bile dönebilecektir. Bazı çalışmalarda NASH oluşturulan farelerde

fibrozisin geliştiği ve karaciğerde kollajen depolandığı görölmüş ancak Pin-1 knock out farelerde hiç kollajen depolanması olmamış (7, 90, 91). Tumor growth factor β 1 (TGF β 1) ve connective tissue growth factor (CTGF) fibrozis oluşumuna neden olan önemli pro-fibrotik sitokinlerdir ve NASH oluşturulan normal farelerde karaciğer düzeylerinde artış olmuşken Pin-1 knockout olan farelerde bu sitokinlerin düzeylerinin ciddi anlamda düşüş gösterdiği tespit edilmiştir (7). Hepatic stellate cells (HSC) aktivasyonun karaciğer fibrozisinde kritik rolü olduğu bilinmektedir. TGF β 1 ve değişik lipopolisakkaritler aktive olmaktadır ve matriks üreten miyofibroblastlara dönüşmektedir böylece karaciğerde fibrozisine neden olmaktadır (92). HSC'nin neden olduğu fibrotik süreci aktif bir form olan SM'nin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi sonucunda Pin-1 knockout farelerde bunun düzeyinin tespit edilemeyecek kadar az olduğu görölmüştür (7). NASH'ın ikinci vuruş basamağı inflamasyon, oksijen radikalleri ve fibrozis ile sonuçlanmaktadır. TGF β ve CTGF önemli profibrotik sitokinlerdir. Bu sitokinlerin artışı hem insan karaciğerinde hem de NASH oluşturulmuş fare karaciğerlerinde fibrozise neden olmaktadır. Heriki sitokin de Pin-1 knockout farelerde tespit edilemeyecek kadar düşük düzeylerde olduğu tespit edilmiştir (7, 69). Ayrıca bazı çalışmalarda Pin-1'in P53 transaktivasyonu ile CTGF sentezini arttırdığı bildirilmiştir (66, 93). NASH oluşturulmuş farelerde hematopoetik Pin-1 düzeyinin NASH'ın progresyonunda yer aldığı ve basit steatozdan ileri fibrozise giden yolda yer alabileceği gösterilmiştir. Ayrıca Kupffer hücrelerinin ömürleri göz önüne alındığında hem hematopoetik hem de non-hematopoetik Pin-1

düzeylerinin NASH progresyonunda ve fibroziste yeri olduğu anlaşılmaktadır (7, 94).

Pin-1 inhibisyonu 2 yolla mümkün olabilir. Birincisi Pin-1 genin siRNA veya shRNA üzerinden karaciğerde susturulması böylece karaciğerde Pin-1 ekspresyonu azaltılmış olur. İkinci olarak ise karaciğere veya makrofajlara spesifik Pin-1 inhibitörlerinin salınması yoluyla Pin-1 inhibisyonun sağlanması. Reese ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada juglone adlı Pin-1 inhibitörü ile farelerde böbrek fibrozisin geriletildiği gösterilmiştir (12). Bu çalışmada Pin-1 inhibitörünün smad veya oksidatif stres üzerinden etkili olduğunu iddia etmişlerdir.

Değişik bazı çalışmalarda Pin-1 salınım artışının bazı malignitelerin fizyopatolojilerinde yer alabileceği gösterilmiştir. Meme kanserli hastalarda Pin-1 düzeyinin tümör progresyonuna ve metastaza neden olabileceği ortaya konmuştur (10). Pin-1'in kanser patogenezindeki en önemli rolünün değişik bazı onkolojik yolları aktive etmesine bağlı olduğu düşünülmektedir (11, 80, 95). Ayrıca Pin-1 inhibisyonun önemli anti kanser etkileri mevcuttur ve bu etkiler bazı çalışmalarda gösterilmiştir (58, 96). Konik hepatitler ve belki de NASH prognozuyla ilişkili olabilen hepatoceluler karsinom (HCC) patogenezinde Pin-1'in rolüyle ilgili henüz çalışma bulunmamaktadır ve belki de Pin-1 inhibisyonu sağlanabilirse bu hastalıkların klasik tedavi modaliteleri yanında HCC gelişiminin engellenmesi de sağlanabilir. Bizim bu çalışmayla gösterdiğimiz bu sonuçlar ileride HCC ile ilgili yapılabilecek çalışmalara yol gösterici olacaktır.

Pin-1 düzeyinin Alzheimer hastalığının patolojisinde yer aldığı ve hastalığın progresyonuna neden olan nörodejenerasyonda rol aldığı gösterilmiştir

(8, 9, 97). Bunun sonucu olarak Pin-1 inhibisyonu ile hastalığın geriletebileceği düşünölmüş ve bununla ilgili çalışmalar devam etmektedir (9).

6. SONUÇLAR

- Kronik HCV, kronik HBV, NASH hastaları ve kontrol grupları yaş açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ve bütün yaşlarda görülebilecek hastalıklar olduğu görüldü.
- Vücut kitle indeksleri gruplar arasında karşılaştırıldığında NASH grubunda en yüksek olduğu görüldü ve bunun hastalık oluşumuyla ilişkili olduğu tespit edildi.
- Kadın ve erkekler sayıları açısından gruplar birbirine benzerdi ve cinsiyetin sonuçlara etkili olabilecek etkileri dışlanmış oldu.
- Gruplar arasında kan parametreleri karşılaştırıldığında NASH ve kronik HCV lehine düşük değerlerin olduğu görüldü. Bu sonuç muhtemelen hastalıkların ilerlemesine bağlı olarak görüldü ve literatürle uyumlu bulundu. İlerlemiş fibrozisi olan hastalarda doğal olarak trombosit sayısı ve hemoglobin değerleri düşük bulundu ve bu sirotik süreçle ilişkiliydi.
- Serum Pin-1 düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında en yüksek değerlerin NASH grubunda olduğu ve en düşük değerlerin kontrol grubunda olduğu görüldü. Ayrıca kronik HCV hastalarında kronik HBV hastalarına göre daha yüksek değerler görüldü bu sonuç hastalığın steatozisi ve fibrozis düzeyleri ile ilişkiliydi.
- Karaciğerin nekroinflamasyon ve hepatoselüler hasarını gösteren testler ALT, AST ve GGT değerleri gruplar arasında anlamlı düzeyde farklıydı. Ancak literatürle uyumlu olarak ALP değerleri arasında fark yoktu. Bu sonuç ALP

düzeyini etkileyen başka hastalıkların varlığıyla ilişkili olabilir çünkü karaciğer spesifik değerler beklendiği gibi NASH, HCV ve HBV gruplarında anlamlı yüksekti.

- Hastaların ve kontrol grubunun lipid profil düzeyleri birbirine benzerdir ve steatozise lipid profilin etkisi bu sonuçlarla dışlanmış oldu.
- Pin-1 düzeyi ile NASH hastalarının histopatolojik özellikleri (steatozis, lobüler inflamasyon, balonlaşma ve fibrotik skor) karşılaştırıldığında hepsiyle istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark olduğu görüldü. En yüksek ilişkinin steatozis özelliğiyle olduğu tespit edildi.
- Pin-1 düzeyi ile kronik HCV ve kronik HBV hastaların nekroinflamatuvar aktiviteleri ve fibrotik evreleri arasındaki ilişkiye bakıldığında HCV’de daha fazla olmak üzere anlamlı düzeyde ilişki vardı.
- NASH hastalarının ileri fibrozis varlığını tahmin etmede univariate analizde anlamlı çıkan faktörler ileri analizle multivariate analize konduğunda serum Pin-1 düzeyinin ileri fibrozise bağımsız etkisi olduğu görüldü. Buna göre bazal Pin-1 düzeyi hastalık progresyonunda iyi bir belirteç olarak da kullanılabilir.
- İleriki tedavi yaklaşımları açısından Pin1 inhibisyonu tedavileri geliştirilirse hepatosteatoz, fibrozis hatta HCC’nin engellenmesi için yeni yaklaşımlar geliştirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Annals of internal medicine*. 2006;144(10):705-14.
2. Kamal SM, Nasser IA. Hepatitis C genotype 4: What we know and what we don't yet know. *Hepatology*. 2008;47(4):1371-83.
3. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *The New England journal of medicine*. 2004;350(11):1118-29.
4. Amarapurkar D, Kamani P, Patel N, Gupte P, Kumar P, Agal S, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: population based study. *Annals of hepatology*. 2007;6(3):161-3.
5. Liakina V, Speiciene D, Irnius A, Semuchiniene T, Valantinas J. Association of the prevalence and grade of steatosis in patients with chronic hepatitis C with the host and viral factors. *Acta gastro-enterologica Belgica*. 2007;70(3):260-6.
6. Peng D, Han Y, Ding H, Wei L. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B patients is associated with metabolic factors more than viral factors. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008;23(7 Pt 1):1082-8.
7. Nakatsu Y, Otani Y, Sakoda H, Zhang J, Guo Y, Okubo H, et al. Role of Pin1 protein in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(53):44526-35.

8. Sultana R, Boyd-Kimball D, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Klein JB, et al. Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiology of aging*. 2006;27(11):1564-76.
9. Wildemann D, Erdmann F, Alvarez BH, Stoller G, Zhou XZ, Fanghanel J, et al. Nanomolar inhibitors of the peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1 from combinatorial peptide libraries. *Journal of medicinal chemistry*. 2006;49(7):2147-50.
10. Kim BC, Han SI, Lim SC. Interpretation of Pin-1 and VEGF-C expression in breast infiltrating duct carcinoma. *Oncology reports*. 2009;22(6):1381-90.
11. Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Petkova V, et al. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *The EMBO journal*. 2001;20(13):3459-72.
12. Reese S, Vidyasagar A, Jacobson L, Acun Z, Esnault S, Hullett D, et al. The Pin 1 inhibitor juglone attenuates kidney fibrogenesis via Pin 1-independent mechanisms in the unilateral ureteral occlusion model. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2010;3:1.
13. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*. 2004;40(1):185-94.

14. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(8):1067-75.
15. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic*. 1980;55(7):434-8.
16. Ruhl CE, Everhart JE. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver. *Clinics in liver disease*. 2004;8(3):501-19, vii.
17. Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2004;36(4):231-42.
18. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006;44(4):865-73.
19. Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2006;21(1 Pt 1):138-43.
20. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.

21. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England journal of medicine*. 2002;346(16):1221-31.
22. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003;37(5):1202-19.
23. Cortez-Pinto H, Baptista A, Camilo ME, De Moura MC. Nonalcoholic steatohepatitis--a long-term follow-up study: comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Digestive diseases and sciences*. 2003;48(10):1909-13.
24. Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*. 2004;444(1):3-12.
25. Gramlich T, Kleiner DE, McCullough AJ, Matteoni CA, Boparai N, Younossi ZM. Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Human pathology*. 2004;35(2):196-9.
26. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology*. 2000;118(6):1117-23.
27. Boden G. Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Current diabetes reports*. 2006;6(3):177-81.
28. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology*. 2001;121(1):91-100.

29. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37(4):917-23.
30. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30(6):1356-62.
31. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Archives of virology*. 1998;143(12):2493-503.
32. Koike K, Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2006;34(2):65-73.
33. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology*. 2008;47(1):321-31.
34. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997;349(9055):825-32.
35. McCaughan GW, Zekry A. Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *Journal of hepatology*. 2004;40(3):368-74.

36. Scheuer PJ, Standish RA, Dhillon AP. Scoring of chronic hepatitis. Clinics in liver disease. 2002;6(2):335-47, v-vi.
37. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. Hepatology. 2001;33(6):1358-64.
38. Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Takayama T, et al. Steatosis and intrahepatic hepatitis C virus in chronic hepatitis. Journal of medical virology. 1999;59(2):141-5.
39. Poynard T, Ratziu V, McHutchison J, Manns M, Goodman Z, Zeuzem S, et al. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. Hepatology. 2003;38(1):75-85.
40. Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, Whitehall VH, Shorthouse C, Clouston A, et al. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. Hepatology. 1999;29(4):1215-9.
41. Adinolfi LE, Utili R, Andreana A, Tripodi MF, Marracino M, Gambardella M, et al. Serum HCV RNA levels correlate with histological liver damage and concur with steatosis in progression of chronic hepatitis C. Digestive diseases and sciences. 2001;46(8):1677-83.
42. Hickman IJ, Powell EE, Prins JB, Clouston AD, Ash S, Purdie DM, et al. In overweight patients with chronic hepatitis C, circulating insulin is associated

with hepatic fibrosis: implications for therapy. *Journal of hepatology*. 2003;39(6):1042-8.

43. Ratziu V, Munteanu M, Charlotte F, Bonyhay L, Poynard T, Group LS. Fibrogenic impact of high serum glucose in chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*. 2003;39(6):1049-55.
44. Persico M, Iolascon A. Steatosis as a co-factor in chronic liver diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2010;16(10):1171-6.
45. Department of Veterans Affairs Hepatitis CRC, Yee HS, Currie SL, Darling JM, Wright TL. Management and treatment of hepatitis C viral infection: recommendations from the Department of Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center program and the National Hepatitis C Program office. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(10):2360-78.
46. Kowdley KV, Wang CC, Welch S, Roberts H, Brosgart CL. Prevalence of chronic hepatitis B among foreign-born persons living in the United States by country of origin. *Hepatology*. 2012;56(2):422-33.
47. Rehermann B. Immune responses in hepatitis B virus infection. *Seminars in liver disease*. 2003;23(1):21-38.
48. Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *Journal of immunology*. 1998;160(4):2013-21.
49. Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2001;34(4 Pt 1):617-24.

50. Baptista A, Bianchi L, De Groote J, Desmet VJ, Ishak KG, Korb G, et al. The diagnostic significance of periportal hepatic necrosis and inflammation. *Histopathology*. 1988;12(6):569-79.
51. Ishak KG. Pathologic features of chronic hepatitis. A review and update. *American journal of clinical pathology*. 2000;113(1):40-55.
52. Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology*. 2000;31(1):241-6.
53. Ferrell LD, Greenberg MS. Special stains can distinguish hepatic necrosis with regenerative nodules from cirrhosis. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2007;27(5):681-6.
54. Hoofnagle JH, Schafer DF. Serologic markers of hepatitis B virus infection. *Seminars in liver disease*. 1986;6(1):1-10.
55. Hodinka RL. The clinical utility of viral quantitation using molecular methods. *Clinical and diagnostic virology*. 1998;10(1):25-47.
56. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000--summary of a workshop. *Gastroenterology*. 2001;120(7):1828-53.
57. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: 2008 update. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2008;6(12):1315-41; quiz 286.

58. Lu KP. Pinning down cell signaling, cancer and Alzheimer's disease. Trends in biochemical sciences. 2004;29(4):200-9.
59. Smet C, Wieruszeski JM, Buee L, Landrieu I, Lippens G. Regulation of Pin1 peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity by its WW binding module on a multi-phosphorylated peptide of Tau protein. FEBS letters. 2005;579(19):4159-64.
60. Ranganathan R, Lu KP, Hunter T, Noel JP. Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. Cell. 1997;89(6):875-86.
61. Lu KP, Finn G, Lee TH, Nicholson LK. Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. Nature chemical biology. 2007;3(10):619-29.
62. Chao Y, Xing Y, Chen Y, Xu Y, Lin Z, Li Z, et al. Structure and mechanism of the phosphotyrosyl phosphatase activator. Molecular cell. 2006;23(4):535-46.
63. Leulliot N, Vicentini G, Jordens J, Quevillon-Cheruel S, Schiltz M, Barford D, et al. Crystal structure of the PP2A phosphatase activator: implications for its PP2A-specific PPIase activity. Molecular cell. 2006;23(3):413-24.
64. Magnusdottir A, Stenmark P, Flodin S, Nyman T, Hammarstrom M, Ehn M, et al. The crystal structure of a human PP2A phosphatase activator reveals a novel fold and highly conserved cleft implicated in protein-protein interactions. The Journal of biological chemistry. 2006;281(32):22434-8.

65. Zhou XZ, Kops O, Werner A, Lu PJ, Shen M, Stoller G, et al. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Molecular cell*. 2000;6(4):873-83.
66. Zacchi P, Gostissa M, Uchida T, Salvagno C, Avolio F, Volinia S, et al. The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature*. 2002;419(6909):853-7.
67. Esnault S, Shen ZJ, Malter JS. Pinning down signaling in the immune system: the role of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in immune cell function. *Critical reviews in immunology*. 2008;28(1):45-60.
68. Esnault S, Rosenthal LA, Shen ZJ, Sedgwick JB, Szakaly RJ, Sorkness RL, et al. A critical role for Pin1 in allergic pulmonary eosinophilia in rats. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(5):1082-8.
69. Shen ZJ, Esnault S, Rosenthal LA, Szakaly RJ, Sorkness RL, Westmark PR, et al. Pin1 regulates TGF-beta1 production by activated human and murine eosinophils and contributes to allergic lung fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(2):479-90.
70. Yeh ES, Means AR. PIN1, the cell cycle and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(5):381-8.
71. Lu KP. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer cell*. 2003;4(3):175-80.
72. Wulf G, Ryo A, Liou YC, Lu KP. The prolyl isomerase Pin1 in breast development and cancer. *Breast cancer research: BCR*. 2003;5(2):76-82.

73. Driver JA, Lu KP. Pin1: a new genetic link between Alzheimer's disease, cancer and aging. *Current aging science*. 2010;3(3):158-65.
74. Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature*. 1999;399(6738):784-8.
75. Lim JM, Hong MJ, Kim S, Oh DB, Kang HA, Kwon O. Iron chelator-inducible expression system for Escherichia coli. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2008;18(8):1357-63.
76. Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyaama A, Ono H, Fujishiro M, Horike N, et al. Pin1 associates with and induces translocation of CRTAC2 to the cytosol, thereby suppressing cAMP-responsive element transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(43):33018-27.
77. Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyaama A, Zhang J, Ono H, Fujishiro M, et al. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with insulin receptor substrate-1 and enhances insulin actions and adipogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(23):20812-22.
78. Tun-Kyi A, Finn G, Greenwood A, Nowak M, Lee TH, Asara JM, et al. Essential role for the prolyl isomerase Pin1 in Toll-like receptor signaling and type I interferon-mediated immunity. *Nature immunology*. 2011;12(8):733-41.
79. Atkinson GP, Nozell SE, Harrison DK, Stonecypher MS, Chen D, Benveniste EN. The prolyl isomerase Pin1 regulates the NF-kappaB signaling pathway

- and interleukin-8 expression in glioblastoma. *Oncogene*. 2009;28(42):3735-45.
80. Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G, et al. Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Molecular cell*. 2003;12(6):1413-26.
 81. Gelman AE, Zhang J, Choi Y, Turka LA. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *Journal of immunology*. 2004;172(10):6065-73.
 82. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
 83. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Seminars in liver disease*. 2001;21(1):3-16.
 84. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology*. 1995;22(6):696-9.
 85. Butterfield DA, Reed T, Perluigi M, De Marco C, Coccia R, Cini C, et al. Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. *Neuroscience letters*. 2006;397(3):170-3.
 86. Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, et al. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal

- proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*. 2006;22(2):223-32.
87. Da Silva Morais A, Lebrun V, Abarca-Quinones J, Brichard S, Hue L, Guigas B, et al. Prevention of steatohepatitis by pioglitazone: implication of adiponectin-dependent inhibition of SREBP-1c and inflammation. *Journal of hepatology*. 2009;50(3):489-500.
 88. Khanal P, Yun HJ, Lim SC, Ahn SG, Yoon HE, Kang KW, et al. Proyl isomerase Pin1 facilitates ubiquitin-mediated degradation of cyclin-dependent kinase 10 to induce tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Oncogene*. 2012;31(34):3845-56.
 89. Saberi M, Bjelica D, Schenk S, Imamura T, Bandyopadhyay G, Li P, et al. Novel liver-specific TORC2 siRNA corrects hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009;297(5):E1137-46.
 90. Witek RP, Stone WC, Karaca FG, Syn WK, Pereira TA, Agboola KM, et al. Pan-caspase inhibitor VX-166 reduces fibrosis in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009;50(5):1421-30.
 91. Uno M, Kurita S, Misu H, Ando H, Ota T, Matsuzawa-Nagata N, et al. Tranilast, an antifibrogenic agent, ameliorates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2008;48(1):109-18.

92. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nature medicine*. 2007;13(11):1324-32.
93. Zheng H, You H, Zhou XZ, Murray SA, Uchida T, Wulf G, et al. The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature*. 2002;419(6909):849-53.
94. Kassel KM, Guo GL, Tawfik O, Luyendyk JP. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency does not affect steatosis or inflammation in livers of mice fed a methionine-choline-deficient diet. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2010;90(12):1794-804.
95. Ryo A, Nakamura M, Wulf G, Liou YC, Lu KP. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nature cell biology*. 2001;3(9):793-801.
96. Liou YC, Zhou XZ, Lu KP. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends in biochemical sciences*. 2011;36(10):501-14.
97. Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, et al. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology*. 2005;64(7):1152-6.

8. ÖZET

Kronik Hepatit C, kronik hepatit B ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalarında serum Pin-1 protein düzeyleri ile karaciğerdeki histopatolojik değişiklikleri arasındaki ilişkiler

Kronik hepatit B (HBV), kronik hepatit C (HCV) ve non alkolik steatohepatit (NASH) hastalıkları toplumda sık görülen karaciğer hastalıklarındandır. Pin-1 proteini izomerizasyonda görev alan ve çeşitli inflamatuvar süreçlerde rol oynayan önemli bir proteindir. Pin-1 proteinin, HCV, HBV ve NASH'nın patogenezindeki rolü ile ilgili henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Pin-1 proteinin inflamatuvar, steatoz ve fibrozis süreçlerinde yer aldığı değişik bazı deneysel fare çalışmalarında gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı serum Pin-1 protein düzeylerinin sağlıklı kontrol grubu, NASH ve kronik viral hepatit hastalarındaki konsantrasyonlarını belirlemek, bu hasta gruplarında biyokimyasal ve histopatolojik özellikleriyle ilişkisini değerlendirerek, steatozis, inflamasyon ve fibrozisi tahmin etmede tanısal bir belirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmaktır. Prospektif olarak 66 kronik HCV, 28 kronik HBV, 55 NASH hastası çalışmaya alındı ve karaciğer biyopsileri yapıldı, 29 da sağlıklı gönüllü kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Histolojik değerlendirmede kronik hepatitlerde Ishak skorlaması ve NASH için Brunt skorlaması kullanıldı. Serum Pin-1 protein düzeyleri kontrol grubunda: $27,11 \pm 7,07$ pg/ml, HBV'de: $27,79 \pm 11,69$ pg/ml, HCV'de: $35,72 \pm 14,33$ pg/ml ve NASH hastalarında: $43,56 \pm 20,88$ pg/ml ve $P < 0,01$ olarak bulundu. HBV-kontrol grupları arasında $P = 0,64$, kontrol-HCV grupları arasında $P = 0,003$, kontrol-

NASH grupları $P < 0,001$, HBV-HCV arasında $P = 0,017$, HBV-NASH arasında $P < 0,001$ ve HCV-NASH grupları arasında da $P = 0,05$ olarak bulundu. En yüksek değerler NASH grubunda görülürken en düşük değerler kontrol grubunda bulundu. Kronik hepatit hastalarının hem NIA hem de fibrozis histolojik özellikleriyle istatistiksel anlamlı ilişki bulundu $P < 0,001$. NASH hastalarının histolojik özellikleri ile Pin-1 düzeyleri arasındaki ilişki araştırıldığında steatozis, inflamasyon, balonlaşma ve fibrozis ile anlamlı düzeyde ilişki olduğu tespit edildi $P < 0,001$. Ayrıca NASH hastalarının ileri fibrozis tahmin edilebilirliği için yapılan multivariate analizde de Pin-1 düzeyinin bağımsız bir predikte edici faktör olduğunu bulduk OR:1,052, %95 CI:1,014-1,091), $P = 0,008$. Sonuç olarak serum Pin-1 düzeyinin kronik viral hepatit ve NASH hastalarının fizyopatolojisinde yer alabileceği ve hastalık progresyonunda rolü olabileceğini tespit ettik.

Anahtar kelimeler: HCV, HBV, NASH ve Pin-1 protein

9. SUMMARY

The association between serum Pin-1 protein levels and liver histopathologic features of chronic hepatitis B, chronic hepatitis C and nonalcoholic steatohepatitis diseases

Chronic hepatitis C (HCV), chronic hepatitis B (HBV) and Non alcoholic steatohepatitis (NASH) are common liver diseases. Pin-1 protein plays role in isomerization and is involved in different inflammatory process. There are not enough data concerning the role of Pin-1 in HCV, HBV and NASH diseases. It has been shown that Pin-1 takes place in steatosis, inflammatory and fibrosis processes in some rat models. The aims of this study are to evaluate the importance of serum Pin-1 levels of patients with NASH, HBV, HCV and healthy controls, to investigate the association between Pin-1 levels and histopathological features and whether Pin-1 could be a predicting factor of advanced liver fibrosis or not. Sixty six HCV, 28 HBV, 55 NASH and 29 healthy controls who fulfilled the inclusion and exclusion criteria were included in the study. Histopathological evaluation for HCV and HBV was done by using Ishak scoring system and Brunt scoring system was also used for NASH. Serum Pin-1 protein levels among control, HBV, HCV and NASH were $27,11 \pm 7,07$; $27,79 \pm 11,69$; $35,72 \pm 14,33$ and $43,56 \pm 20,88$, respectively, and there was statistically significant difference $P < 0,001$. When we compared values between groups after Bonferroni corrections the results were as follows: HBV-control; $P = 0,64$, HCV-control; $P = 0,003$, NASH-control $P < 0,001$, HBV-HCV; $P = 0,017$, HBV-NASH; $P < 0,001$ and HCV-NASH; $P = 0,05$. The highest values were in NASH group while the lowest were

in the control group. There were statistically significant correlations between histopathologic features of chronic hepatitis (NIA and fibrosis) and serum Pin-1 protein levels $P < 0,001$. When we investigated the correlations between histopathologic features of NASH (inflammation, steatosis, ballooning and fibrosis) and serum Pin-1 protein levels there were also significant correlations $P < 0,001$. We analysed the prediction of advanced liver fibrosis in NASH patients. Serum Pin-1 level was an independent predicting risk factor in multivariate logistic regression analysis OR:1,052, 95% CI: (1,014-1,091), $P = 0,008$. In conclusion, serum Pin-1 protein may play a role in the pathophysiology of chronic hepatitis and NASH patients and also it is a predicting factor of advanced liver fibrosis due to NASH.

Keywords: HCV, HBV, NASH and Pin-1 protein

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Mustafa Cengiz

Doğum Tarihi : 22.10.1978

Doğum Yeri : Gercüş

Medeni Hali : Evli

e-posta : drmustafacen@gmail.com

Eğitim :

1986-1991 Hürriyet ilköğretim okulu

1991-1996 Batman Anadolu Lisesi

1996-1997 Yahya Kemal Beyatlı Lisesi

1997-2003 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

2003-2009 Hacettepe Üniversitesi İç Hastalıkları

2009-2013 Gazi Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı

Yabancı Dil : İngilizce