

Hepatit B Virüsüne (HBV) Karşı Doğal Bağışık, Kronik HBV Enfeksiyonu Olan ve HBV ile Karşılaşmamış Bireylerdeki “Stimulator of Interferon Genes (STING)” mRNA Düzeylerinin Karşılaştırılması

Comparison of mRNA Levels of Stimulator of Interferon Genes (STING) in Individuals with Natural Immunity to Hepatitis B Virus (HBV), and in those with Chronic Hepatitis B Infection and without HBV

Bünyamin KASAP¹(ID), Celal Kurtuluş BURUK²(ID), Neşe KAKLIKKAYA²(ID), Esra ÖZKAYA²(ID), Zeliha AYDIN KASAP³(ID), Faruk AYDIN²(ID)

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi Trabzon Kanuni Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Trabzon.
¹ University of Health Sciences Trabzon Kanuni Training and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Trabzon, Turkey.

² Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

² Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Turkey.

³ Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı, Trabzon.

³ Karadeniz Technical University Institute of Health Sciences, Department of Biostatistics and Medical Informatics, Trabzon, Turkey.

Makale Atfı: Kasap B, Buruk CK, Kaklıkkaya N, Özkaya E, Aydın Kasap Z, Aydın F. Hepatit B virüsüne (HBV) karşı doğal bağışık, kronik HBV enfeksiyonu olan ve HBV ile karşılaşmamış bireylerdeki “stimulator of interferon genes (STING)” mRNA düzeylerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2020;54(1):66-78.

ÖZ

Tüm dünyada yaklaşık 350-400 milyon kişinin kronik olarak hepatit B virüsü (HBV) ile enfekte olduğu ve her yıl yaklaşık bir milyon kişinin de HBV ile ilişkili hastalıklar nedeniyle hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Enfeksiyonun kronikleşmesinde virüse ve konağa ait faktörlerin, özellikle de konağın bağışıklık sisteminin rol oynadığı ileri sürülmektedir. “Stimulator of interferon genes (STING)” hücre içindeki DNA varlığını algılayarak çeşitli sitokinlerin sentezini artıran “patern tanıma reseptörü (PRR)” ailesinin bir üyesi olup, bu proteinin HBV enfeksiyonuna karşı bağışıklık sisteminin önemli bir elemanı olabileceği düşünülmektedir. Bireylerde STING ekspresyonundaki farklılıklar ile HBV'nin kronikleşmesi arasında bir ilişkinin olabileceği varsayılarak kurgulanan bu çalışma, HBV'ye karşı doğal bağışık bireylerde, kronik hepatit B hastalarında ve HBV ile karşılaşmamış normal popülasyonda yer alan bireylerde STING gen ekspresyon düzeyinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Çalışmaya 18-65 yaş aralığında HBV'ye karşı doğal bağışık birinci gruptan 30 kişi, kronik hepatit B hastası ikinci gruptan 30 kişi ve HBV ile karşılaşmamış normal popülasyondaki üçüncü gruptan 30 kişi olmak üzere toplam 90 kişi dahil edilmiştir. Her bir katılımcıdan tam kan örneği alınıp periferik kan mononükleer hücreleri (PKMNH) izole edilmiştir. Elde edilen PKMNH'den total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildikten son-

ra STING gen ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemiyle belirlenmiştir. Rt-PCR işleminden sonra $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü uygulanarak normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya katılan HBV'ye karşı doğal bağışık bireylerden oluşan grubun STING ekspresyon düzeylerinin ortalaması 0.084 ± 0.026 , HBV ile karşılaşmamış bireylerden oluşan grubun STING ekspresyon düzeylerinin ortalaması 0.082 ± 0.032 , kronik hepatit B hastalarından oluşan grubun STING ekspresyon düzeylerinin ortalaması ise 0.075 ± 0.022 olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$). Literatür taramasına göre, çalışmamız HBV enfeksiyonunun kronikleşmesinde STING ekspresyon düzeyinin araştırıldığı ilk çalışmadır. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamasına rağmen, doğal bağışık bireylerdeki STING ekspresyon düzeylerinin kronik hepatit B hastalarındaki STING ekspresyon düzeylerinden yaklaşık %10 oranında daha fazla bulunması önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Hepatit B virüsü; STING; mRNA.

ABSTRACT

It has been estimated that currently 350-400 million people have been chronically infected with the hepatitis B virus (HBV) worldwide and approximately one million people die each year due to HBV related diseases. It has been suggested that the viral and host factors, especially the host immune system, may play a role in the chronicity of the HBV infection. Stimulator of interferon genes (STING) is one of the members of the pattern recognition receptor (PRR) that detects the presence of DNA in a human cell, activate synthesis of various cytokines and this protein is thought to be an important member of the immune system against HBV infection. Based on the assumption that there may be a relationship between the differences of STING expression in individuals and HBV chronicity, the aim of this study was to investigate STING gene expression levels in individuals naturally immunized against HBV, in chronic hepatitis B infected patients and in normal individuals who have not been exposed to HBV. A total of 90 volunteers have been included in the study from the age range of 18 to 65, in which the first group consists of 30 individuals naturally immunized against HBV, the second group consists of 30 chronically hepatitis B infected patients while the third group consists of 30 healthy population members who have not been exposed to HBV. Whole blood samples were taken from each participant and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated afterwards. Total RNA was isolated from PBMC. After the synthesis of cDNA from the total RNA, STING gene expression levels were determined by real time polymerase chain reaction (Rt-PCR) method. Normalization was performed by applying the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula after Rt-PCR procedure. STING expression level of the naturally immunized group was calculated as 0.084 ± 0.026 on average, average STING expression level of healthy population group was 0.082 ± 0.032 and STING expression level of chronically infected patients group was 0.075 ± 0.022 on average. There was no statistically significant difference between the groups ($p > 0.05$). To our knowledge, this is the first study investigating the role of STING expression in the chronicity of HBV. Although there was no statistically significant difference between the groups, the data that showed STING expression levels in naturally immunized individuals were approximately 10% higher than those in chronic hepatitis B patients and was considered as an important finding.

Keywords: Hepatitis B virus; STING; mRNA.

GİRİŞ

Hepatit B virüsü (HBV), tüm dünyada yaklaşık 350-400 milyon kişiyi kronik olarak enfekte ettiği düşünülen hepatotropik bir DNA virüsüdür. Her yıl yaklaşık bir milyon kişinin fulminan hepatit, siroz veya hepatoselüler karsinom (HSK) gibi HBV ile ilişkili hastalıklardan dolayı hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir^{1,2}.

Doğal bağışık yanıt oluşumu ile sonuçlanan HBV enfeksiyon sürecinde virüsün doğal immün sistem tarafından algılanmasını takiben salınan interferon (IFN)-alfa ve IFN-beta,

virüsün replikasyonunu baskılamaktadır. Doğal immün yanıt bir yandan da edinsel immün yanıtı aktiveştirir. HBV ile enfekte hepatositler CD8 T lenfositler tarafından hem sitolitik hem de sitolitik olmayan yollarla ortadan kaldırılarak enfeksiyon sonlandırılır. Akut enfeksiyon sırasında immün sistem etkin bir şekilde aktifleşip virüsü vücuttan temizlemeyi başaramazsa kişi kronik olarak enfekte olmaya devam eder^{3,4}.

HBV enfeksiyonunun immünopatogenezi halen tam olarak aydınlatılamasa da, HBV enfeksiyonunda klinik seyir, enfeksiyona neden olan virüsün genotipi ve altgenotipine, konağın cinsiyetine, immün durumuna ve HBV ile karşılaşma yaşına göre değişkenlik göstermektedir⁵.

Viral enfeksiyonların seyrini etkileyen konak faktörlerinden biri de "stimulator of interferon genes (STING)" proteindir⁶. STING, DNA virüsleri başta olmak üzere çeşitli mikrobiyal etkenlerle oluşan enfeksiyonlarda doğal immün yanıtı harekete geçiren patern tanıma reseptörü (pattern recognition receptor, PRR) üyelerinden biridir. STING 379 aminoasitten oluşan bir protein olup amino terminali ile endoplazmik retikulum yüzeyine tutunur. İnsan vücudunda makrofaj, dendritik hücre, T hücreleri, endotel, epitel ve fibroblast gibi hücrelerde bulunur. Sitoplazmadaki DNA varlığını algıladıktan sonra bir dizi ikincil haberci kullanıp özgül transkripsiyon faktörlerini aktiveleştirerek IFN-alfa, IFN-beta, tümör nekroz faktörü (TNF)-alfa ve interlökin (IL)-6 gibi sitokinlerin sentezini artırır. Sitokin salınımına ek olarak özgül CD8 T lenfositlerin aktiveleştirilmesinde görev alır. Özellikle DNA virüslerine karşı oluşan savunmada önemli rol oynadığı gösterilmiştir⁷⁻¹⁰. Ayrıca bazı hastalıklarda STING ekspresyonunun azalmasının kötü prognoz işareti olabileceği belirtilmiştir¹¹. Bu bilgiler STING proteininin HBV'ye karşı gelişen immün yanıtta önemli bir bileşen olabileceğini ve ekspresyon düzeyindeki değişimin HBV enfeksiyonunun seyri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada, HBV'ye karşı doğal bağışık bireyler, kronik hepatit B hastaları ve HBV ile karşılaşmamış bireylerin periferik kan mononükleer hücrelerindeki (PKMNH) bazal STING geni ekspresyonları karşılaştırılarak HBV enfeksiyon sürecinde STING'in potansiyel rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, çalışmamızda katılımcıların yaş ve cinsiyetlerine göre STING ekspresyon düzeyleri de incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 29.07.2016 ve Karar no: 2016/112). Çalışmaya alınma kriterlerini karşılayan kişilere çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verildi ve yazılı onamı alındı.

Hasta Grubu

Çalışmaya 18-65 yaş aralığında HBV'ye karşı doğal bağışık 30, kronik hepatit B hastası 30 ve HBV ile karşılaşmamış normal popülasyondaki 30 kişiden oluşan toplam 90 kişi dahil edildi. Çalışmaya dahil edilecek bireyler belirlenirken immün sistemi baskılayacak ilaç kullananlar, kronik hepatit B hastası olup son altı ay içinde HBV'ye yönelik tedavi almış veya halen almakta olanlar, kronik hepatit C hastası veya kazanılmış immün yetmezlik

sendromu (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) olanlar ve son iki hafta içerisinde enfeksiyöz bir hastalık geçirmiş veya halen geçirmekte olanlar çalışma dışı bırakıldı.

Serolojik Testler

Çalışmaya katılan bireylerin serumlarında HBsAg, anti-HBs, anti-HBc IgG, anti-HCV ve anti-HIV serolojik belirteçlerinin analizi elektrokemilüminesans (ECLIA) yöntemi ile oto-analizör (Roche Cobas 6000 e601 Analizör, Roche Diagnostics, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada, enfekte bireylerin HBV viral yükleri COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (Roche Molecular Systems, ABD) platformunda HBV v 2.0 (Roche Molecular Systems, ABD) kitleri kullanılarak belirlendi. Analizler üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygulandı ve test sonuçları değerlendirildi.

RNA İzolasyonu

Katılımcılardan alınan tam kan örneklerinden PKMNH ayrılması yoğunluk gradiyenti yöntemiyle lenfosit ayrıştırma besiyeri (lymphocyte separation medium, LSM, Capricorn Scientific, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi¹².

Elde edilen PKMNH'den total RNA izolasyonu için PureLink® RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Örneklerden izole edilen RNA konsantrasyonları, NanoDrop 2000c spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak ölçüldü.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İzole edilen total RNA'dan "revert aid first strand cDNA synthesis" (Thermo Fisher Scientific, Litvanya) ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. STING geninin mRNA düzeyi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) kullanılarak belirlendi. Rt-PCR işlemi için LightCycler® 480 System (Roche Molecular Systems, ABD) cihazı kullanıldı. Her örnek için eş zamanlı olarak hem izolasyon ve amplifikasyon basamaklarının kontrolünün hem de normalizasyonun sağlanması amacıyla gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geninin ekspresyon düzeyi de belirlendi.

Her bir reaksiyon için 4 µl cDNA, 12.5 µl 2X SYBR green Rt-PCR karışımı (Biomatik Corporation, Kanada) hedef genlerin ileri ve ters primerlerini içeren, toplam hacmi 25 µl olan PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Çalışmada kullanılan primerlerin oligonükleotit dizileri ve uzunlukları Tablo I'de belirtildiği gibidir. Rt-PCR işlemi iki aşamalı olarak; i)

Tablo I. Kullanılan Primerlerin Oligonükleotit Dizileri ve Uzunlukları

Gen	Oligonükleotit dizisi	Baz çifti	Referans
STING	F- CTATTCTACTACTCCCTCCC	201	14
STING	R- CGCAGATATCCGATGTAATATG		
GAPDH	F- GGTATCGTGAAGGACTCATGA	188	15
GAPDH	R- ATGCCAGTGGCTCCCGTTCAGC		

STING: Stimulator of Interferon Genes.

GAPDH: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz.

95°C 10 dakika başlangıç denatürasyonu, sonrasında 40 döngü boyunca 95°C'de 15 saniye denatürasyon ve 60°C'de 1 dakika primerlerin bağlanması, amplifikasyon ve çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR Green boyasının 533 nm dalga boyunda floresan ölçümü, akabinde, ii) erime eğrisi (melting curve) analizi için 55°C'den 97°C'ye kadar aşamalı denatürasyon ve floresan ölçümü yapılarak gerçekleştirildi. Kantitasyon ve erime eğrisi analizi için LightCycler 480 SW 1.5.1 yazılımı (Roche Molecular Systems, ABD) kullanıldı.

Analiz sonrası, oluşan eğrilerin hedef dizilerin erime noktalarına uygunluğu denetlendi ve her örneğe ait hedef ve kontrol genlerin amplifikasyon eğrilerinin çakışma noktaları (crossing point, cp) elde edildi. Örnekler ve gruplar arasında STING mRNA üretimindeki farklılıkları izlemek ve karşılaştırılabilir veri elde etmek için, STING ve GAPDH amplifikasyonlarına ait cp değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü yardımıyla normalizasyon işlemi gerçekleştirildi ve her örneğe ait rölatif işlem değeri elde edildi¹³. Her bir grup için bu değerlerin ortalaması alındı ve gruplar arasındaki karşılaştırma bu ortalamalar üzerinden yapıldı.

İstatistiksel Analiz

PCR işlemi tamamlandı her örnek için normalizasyon gerçekleştirildikten sonra elde edilen veriler IBM SPSS 22.0 programı ortamında analiz edildi. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların yanı sıra grupların ortalamalarını karşılaştırmak için bağımsız örneklem t testi ile Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Ayrıca, çalışmanın SPSS formatındaki verileri, R programı paketlerinden olan "foreign" paketi aracılığıyla açık kaynak kodlu, R Studio istatistiksel paket programı ortamına, aktararak görselleştirildi. Sonuçlar %95 güven aralığında, $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen kronik hepatit B hasta grubundaki kişilerin serum HBV-DNA düzeyleri 2000 IU/ml'nin altında olup, tedavisiz olarak takip edilen hastalardan oluşmuştur. Ayrıca hastaların tümü HBsAg ve anti-HBc IgG pozitif olarak belirlenmiştir. Bağışık grup ise anti-HBs ve anti-HBc IgG pozitif bireylerden oluşmuştur.

Çalışmaya dahil edilen tüm örnekler anti-HCV ve anti-HIV açısından negatif olarak belirlenmiştir. Kronik hepatit B hastalarının serum alanin aminotransferaz ve aspartat aminotransferaz düzeyleri de normal sınırlar içinde gözlenmiştir.

Çalışmaya katılan HBV'ye karşı doğal bağışık 30 kişinin 17'si kadın 13'ü erkek, kronik hepatit B hastası 30 kişinin 13'ü kadın 17'si erkek, HBV ile karşılaşmamış normal popülasyondaki 30 kişinin 15'i kadın 15'i erkek olarak belirlenmiştir.

Çalışmaya katılan HBV'ye karşı doğal bağışık grubun yaş ortalaması 43.20 ± 9.52 , kronik hepatit B hastası grubun yaş ortalaması 40.06 ± 9.79 ve HBV ile karşılaşmamış normal popülasyondaki kişilerden oluşan grubun yaş ortalaması 39.43 ± 11.32 olup Tablo II'de gösterilmiştir. Grupların yaş ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.317$).

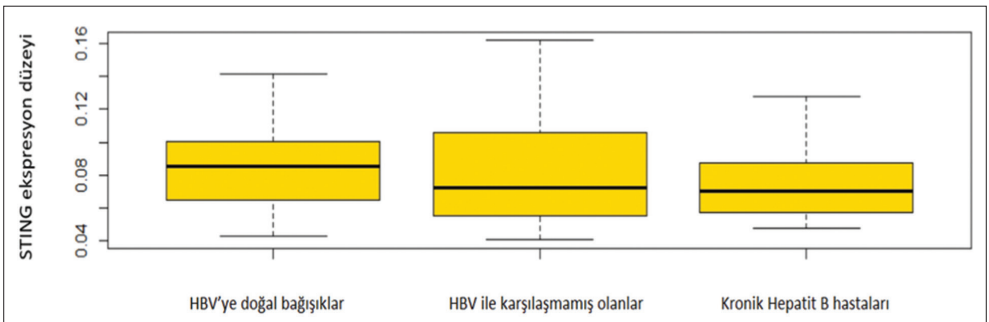
Tablo II. Grupların Yaş Ortalamaları

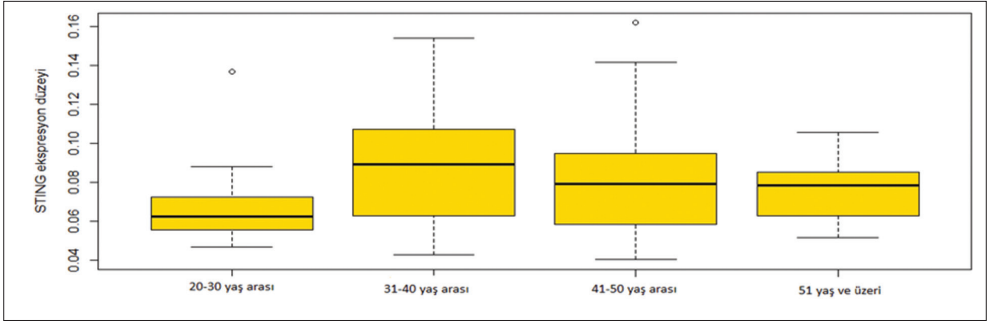
Grup	Sayı (n)	Yaş aralığı	Ortalama ± SD
HBV'ye doğal bağışık kişiler	30	25-63	43.20 ± 9.52
HBV ile karşılaşmamış normal popülasyondaki kişiler	30	20-58	39.43 ± 11.32
Kronik hepatit B hastaları	30	20-57	40.06 ± 9.79

HBV: Hepatit B virüsü.

STING ve GAPDH Rt-PCR işlemi ile elde edilen cp değerleri normalize edildikten sonra gruplara göre incelendiğinde, HBV'ye karşı doğal bağışıklardan oluşan grubun STING ekspresyon düzeyi ortalamasının 0.084 ± 0.026 , HBV ile karşılaşmamış bireylerden oluşan grubun STING ekspresyon düzeyi ortalamasının 0.082 ± 0.032 , kronik hepatit B hastalarından oluşan grubun STING ekspresyon düzeyi ortalamasının ise 0.075 ± 0.022 olduğu tespit edilmiştir. Grupların STING ekspresyon düzeyleri Şekil 1'de belirtilmiştir. Gruplar arasında STING ekspresyon düzeyleri Kolmogrov Smirnov testine göre normal dağılım göstermemiş ve parametrik koşulları sağlamamıştır. Buna göre, yapılan Kruskal Wallis testi sonucunda, $\alpha = 0.05$ yanılma düzeyinde, gruplar arasında STING ekspresyon düzeyi ortalamalarında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p = 0.473$).

Çalışmamıza katılan gönüllüler, tanı fark etmeksizin, yaşları göz önüne alınarak dekatlar halinde dört gruba ayrılmış ve grupların STING ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Yirmi ile 30 yaş aralığındaki 16 (%17.8) gönüllünün STING ekspresyon düzeyi ortalamasının 0.068 ± 0.021 , 31 ile 40 yaş aralığındaki 23 (%25.6) gönüllünün STING ekspresyon düzeyi ortalamasının 0.089 ± 0.032 , 41 ile 50 yaş aralığındaki 36 (%40) gönüllünün STING ekspresyon düzeyi ortalamasının 0.081 ± 0.028 ve 51 yaş üzeri 15 (%16.7) gönüllünün STING ekspresyon düzeyi ortalamasının 0.075 ± 0.017 olduğu görülmüştür. Gönüllülerin yaşlarına göre oluşturulmuş gruplardaki STING ekspresyon düzeyleri Şekil 2'de belirtilmiştir. Bu gruplar analiz edildiğinde, STING ekspresyon düzeylerinin normal dağılım göstermediği belirlenmiştir. Buna göre, yapılan Kruskal Wallis testi sonucunda, $\alpha = 0.05$ yanılma düzeyinde, dekatlar arasında STING ekspresyon düzeyi ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p = 0.106$).

**Şekil 1.** Gruplara göre STING ekspresyon düzeyleri.



Şekil 2. Gönüllülerin tümünün yaşa göre STING ekspresyon düzeyleri.

Çalışmaya katılan gruplar kendi içlerinde de yaşları göze alınarak dekatlar halinde dört gruba ayrılmış, istatistiksel analiz için yeterli örneklem büyüklüğüne ulaşılmasa da fikir verici olacağı düşünülerek ayrıntılı şekilde irdelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda HBV'ye karşı doğal bağışıklardan oluşan grupta STING ekspresyon düzeyi ortalamasının en yüksek 41 ile 50 yaş aralığında ve 0.087 ± 0.023 olduğu görülmüştür. STING ekspresyon düzeylerinin normal dağılım gösterdiği bu dört grubun karşılaştırılması için yapılan Anova testi sonucuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0.727$). HBV ile karşılaşmamış bireylerden oluşan grupta ise STING ekspresyon düzeyi ortalamasının en yüksek 31 ile 40 yaş aralığında ve 0.098 ± 0.030 olduğu saptanmıştır. STING ekspresyon düzeylerinin normal dağılım göstermediği bu dört grubun karşılaştırılması için uygulanan Kruskal Wallis testi sonucuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0.268$). Kronik hepatit B hastalarından oluşan grupta da STING ekspresyon düzeyi ortalamasının en yüksek 31 ile 40 yaş aralığında ve 0.084 ± 0.026 olduğu tespit edilmiştir. STING ekspresyon düzeylerinin normal dağılım gösterdiği bu dört grubun karşılaştırılması için uygulanan Kruskal Wallis testi sonucuna göre bu grupta da istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0.339$). Grupların STING ekspresyon düzeylerinin yaş aralıklarına göre dağılımı Tablo III'te ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

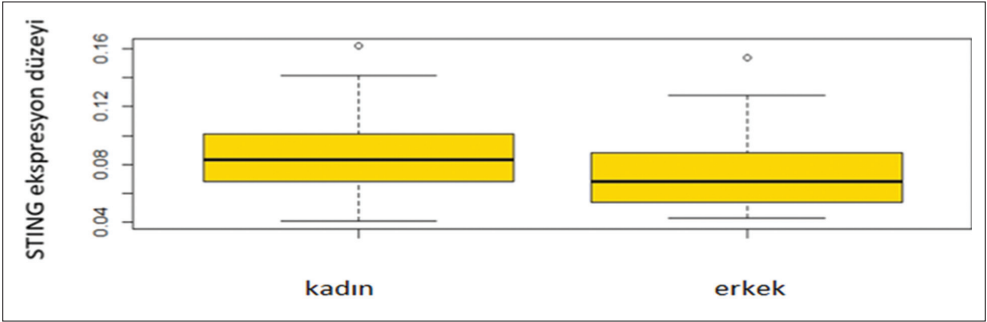
Gönüllüler tanı fark etmeksizin cinsiyet durumlarına göre incelendiğinde, STING ekspresyon düzeyleri normal dağılım göstermektedir. Kadın katılımcıların STING ekspresyon düzeyi ortalaması 0.087 ± 0.027 , erkek katılımcılarınki ise 0.073 ± 0.024 olarak bulunmuştur. Cinsiyete göre oluşturulan grupların STING ekspresyon düzeyleri Şekil 3'te belirtilmiştir. Cinsiyete göre STING ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması için yapılan bağımsız örneklem t testi sonucuna göre, $\alpha=0.05$ yanılma düzeyinde, STING ekspresyon düzeyi ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0.560$).

Çalışmaya katılan gruplar kendi içlerinde cinsiyetleri göz önüne alınarak incelendiklerinde; HBV'ye karşı doğal bağışıklardan oluşan gruptaki 17 kadının STING ekspresyon düzeyi ortalamasının 0.092 ± 0.025 , aynı gruptaki 13 erkeğinkinin ise 0.072 ± 0.025 olduğu görülmüştür. STING ekspresyon düzeylerinin normal dağılım gösterdiği bu iki grubun karşılaştırılması için yapılan bağımsız örneklem t testi sonucuna göre, $\alpha=0.05$

Tablo III. Grupların STING Ekspresyon Düzeylerinin Yaş Aralıklarına Göre Dağılımı

STING ekspresyon düzeyi						
Grup	Yaş aralığı	Sayı (n)	Minimum	Maksimum	Ortalama ± SD	p
HBV'ye karşı doğal bağışık kişiler	20-30	3	0.047	0.088	0.069 ± 0.021	0.747
	31-40	7	0.043	0.133	0.086 ± 0.040	
	41-50	14	0.045	0.142	0.087 ± 0.023	
	51 ve üzeri	6	0.053	0.106	0.081 ± 0.017	
HBV ile karşılaşmamış normal popülasyondaki kişiler	20-30	8	0.052	0.137	0.072 ± 0.027	0.268
	31-40	8	0.054	0.154	0.097 ± 0.030	
	41-50	9	0.040	0.162	0.085 ± 0.042	
	51 ve üzeri	5	0.052	0.091	0.067 ± 0.016	
Kronik hepatit B hastaları	20-30	5	0.047	0.081	0.062 ± 0.012	0.339
	31-40	8	0.051	0.128	0.084 ± 0.026	
	41-50	13	0.048	0.128	0.074 ± 0.023	
	51 ve üzeri	4	0.058	0.103	0.077 ± 0.020	

HBV: Hepatit B virüsü.

**Şekil 3.** Gönüllülerin tümünün cinsiyete göre STING ekspresyon düzeyleri.

yanılma düzeyinde, kadınların STING ekspresyon düzeyi ortalamalarının erkeklerinkinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p= 0.03$). HBV ile karşılaşmamış bireylerden oluşan gruptaki 15 kadının STING ekspresyon düzeyi ortalamasının 0.088 ± 0.035 , aynı gruptaki 15 erkeğinkinin 0.076 ± 0.029 olduğu görülmüştür. STING ekspresyon düzeylerinin normal dağılım göstermediği bu iki grubun karşılaştırılması için yapılan Kruskal Wallis testi sonucunda istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p= 0.272$). Kronik hepatit B hastalarından oluşan gruptaki 13 kadının STING ekspresyon düzeyi ortalamasının 0.080 ± 0.023 , aynı gruptaki 17 erkeğinkinin 0.071 ± 0.021 olduğu görülmüştür. İki grubun STING ekspresyon düzeylerinin normal dağılım göstermediği belirlenmiştir ve yapılan Kruskal Wallis testi sonucunda istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p= 0.267$).

TARTIŞMA

STING, DNA virüslerinin neden olduğu enfeksiyonlar başta olmak üzere çeşitli mikrobiyal enfeksiyonlarda doğal immün yanıtı harekete geçirerek IFN-alfa, IFN-beta ve TNF-alfa gibi sitokinlerin üretimini uyaran bir PRR proteindir¹⁶. STING ekspresyon düzeyi yüksek olan hücrelerin viral enfeksiyona karşı daha dirençli olduğu gözlenmiştir^{13,17}. STING proteininin yokluğunda viral enfeksiyona karşı yeterli sitokin üretilmediği ve enfeksiyonun daha ölümcül seyrettiği ortaya konmuştur^{7,18}. STING aktivasyonu ile HBV replikasyonunun baskılandığı ve bu proteine sahip olmayan farelerin HBV viral yükünün daha yüksek olduğu tespit edilmiştir^{19,20}.

Çalışmamızda bireylerin STING ekspresyonundaki farklılıklar ile akut HBV enfeksiyonu sonrası bağışıklık geliştirilmesi veya enfeksiyonun kronikleşmesi arasında bir ilişki olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla kronik hepatit B hastası olan, HBV'ye karşı doğal bağışıklık geliştiren ve HBV ile karşılaşmamış normal popülasyondaki sağlıklı kişilerden alınan kan örneklerinden PKMNH izole edildikten sonra bu hücrelerdeki STING geni bazal ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Çalışmaya katılan grupların yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımları arasında istatistiksel fark bulunmamaktadır ($p = 0.317$). Grupların STING ekspresyon düzeyi ortalamaları karşılaştırıldığında doğal bağışık kişilerde bu ortalamaların kronik hepatit B'li hastalardan yaklaşık %10 daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak, yapılan analiz sonucunda bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.473$). Bununla birlikte, örneklem hacminin daha geniş tutulacağı bir çalışmada sonuçların anlamlılık düzeyine ulaşması olasıdır.

Yapılan çalışmalarda STING ve Toll benzeri reseptör (Toll-like receptor, TLR) 7-9 agonistleriyle intrahepatik doğal immünitenin aktive edilerek HBV enfeksiyonunun kontrol altına alınabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmalar ışığında kronik hepatit B tedavisinde PRR üzerinden doğal immüniteyi aktive edecek farmakolojik ajanların kullanıma kazandırılması amacıyla geniş çaplı çalışmalar yürütülmektedir²¹.

Guo ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada¹⁰ STING agonisti bir molekül makrofaj hücre kültürüne uygulanmış, salınan sitokinler alınarak HBV ile enfekte hepatosit hücre kültür ortamına tatbik edilmiş ve sonuç olarak hepatositlerdeki kapsit ilişkili HBV-DNA, pregenomik RNA, proteini ve kor proteini miktarının azaldığı ortaya konmuştur. Bu çalışmada HBV ile enfekte farelere periton yolu ile STING agonisti enjekte edildikten yaklaşık bir gün sonra farelerin hepatositlerindeki HBV-DNA miktarının kontrol grubundakilere oranla 13 kat daha az olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada STING agonistlerinin HBV'ye karşı immünoterapi için iyi birer molekül olabileceği ileri sürülmüştür. Bir başka çalışmada ise kronik hepatit B hastalarında STING mRNA düzeyinin kontrol grubundan düşük olduğu ve hastalarda STING mRNA düzeyi azaldıkça HBV-DNA yükünün arttığı, antiviral tedaviye yanıtın ise azaldığı gözlenmiştir²².

Kronik hepatit B taşıyıcıları ile sağlıklı gönüllülerin periferik dendritik hücrelerindeki PRR üyelerinden olan TLR9'un ekspresyon düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada²³ kronik

hepatit B taşıyıcılarında sağlıklı gönüllülere oranla TLR9 ekspresyon düzeylerinin anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada TLR9 ekspresyon düzeylerindeki azalma ile ilişkili bir şekilde IFN-alfa üretiminde de azalma olduğu gözlemlenmiş ve periferik dendritik hücrelerdeki TLR9 ekspresyon düzeylerindeki azalmanın viral persistansa katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür. Tedavisiz kronik hepatit B taşıyıcıları ile sağlıklı gönüllüler arasında yapılan ve PKMNH'lerindeki TLR1-10 ekspresyon düzeylerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada hepatit B taşıyıcılarının PKMNH'lerindeki TLR2 ekspresyon düzeyleri sağlıklı gönüllülerinkilerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. İki grubun TLR4 ekspresyon düzeyleri arasında fark olmamasına rağmen, hepatit B taşıyıcılarında sitokin üretiminin düşük olmasının TLR4 sinyal yolağındaki fonksiyonel bir hasardan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Bu durumun hepatit B enfeksiyonunun kronikleşmesine katkıda bulunabileceği ifade edilmiştir²⁴. Bu çalışmada TLR4 ekspresyon düzeyleri bakımından iki grup arasında fark olmadığı halde fonksiyonel açıdan yetersizlik gözlemlenmiş olması, "STING ekspresyonundan bağımsız fonksiyonel bir yetersizlik söz konusu olabilir mi?" sorusunu akla getirmektedir.

Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada, STING proteinindeki tek nükleotit polimorfizmlerinin STING ekspresyon düzeyini etkilemediği; ancak IFN ve nükleer faktör kappaya aktive edici etkinin farklı oranlarda olsa bile tüm polimorfizmlerde azaldığı gözlemlenmiştir²⁵. Çalışmada STING proteininin ekspresyon düzeyinde farklılık gözlenmeksizin polimorfizme bağlı fonksiyonel kapasitesinin azaldığının gösterilmesi çalışmamız açısından da fikir açıdır. Nitekim, çalışmamızda kronik hepatit B hastaları ile doğal bağışıklar arasında STING proteininin ekspresyon düzeyi ortalamaları açısından farklılık gözlenmese de bu çalışma ışığında polimorfizme bağlı STING'in fonksiyonel kapasitesinde bir azalma söz konusu olabilir. Konunun netliğe kavuşturulması açısından kronik hepatit B hastalarında STING proteininde fonksiyonel yetersizliğe neden olabilecek bir polimorfizm varlığının araştırılması önem arz etmektedir.

Hepatit B enfeksiyonunun kronikleşme sürecine etki eden en önemli konakçı faktörlerinden biri de konağın virüsle karşılaşma yaşıdır. Eğer konakçı yenidoğan döneminde virüsle karşılaşırse enfeksiyon %90 oranında kronikleşirken, 1-5 yaş arasında gerçekleşen karşılaşmalarda kronikleşme oranı %20-30, erişkin yaşta gerçekleşen karşılaşmalarda ise oran %5-10'dur. Kronikleşme oranının yaşla azalmasında; T lenfositlerin zaman içerisinde olgunlaşması ve virüse etkin cevap oluşturabilecek kapasiteye gelmesinin önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir²⁶. Çalışmamıza katılan gönüllüler tanı fark etmeksizin yaşları göz önüne alınarak dekatlar halinde dört gruba ayrılmış, grupların STING ekspresyon düzeyi ortalamaları değerlendirilmiştir. STING ekspresyon düzeyi ortalamalarının 20-30 yaş aralığındaki kişilerde 0.068 ± 0.021 , 31-40 yaş aralığındaki kişilerde 0.089 ± 0.032 , 41-50 yaş aralığındaki kişilerde 0.081 ± 0.028 , 51 yaş ve üstü kişilerde 0.075 ± 0.017 olduğu tespit edilmiştir. Değerlendirme sonucunda; 31-40 yaş aralığındaki katılımcıların STING ekspresyon ortalamalarının, diğer yaş gruplarının ortalamalarından daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ancak yapılan istatistiksel analiz sonucunda dört grubun STING

ekspresyon düzeyi ortalamaları arasında anlamlı bir fark görülmediği ortaya konmuştur ($p= 0.106$). Bununla birlikte, çalışmamıza katılan gönüllüler tanı fark etmeksizin yaşları göz önüne alınarak dekatlar halinde dört gruba ayrılarak incelendiğinde STING ekspresyon düzeyinin 31-40 yaş aralığında en yüksek düzeye ulaştığı, ilerleyen dekatlarda giderek azaldığı belirlenmiştir. Çalışmaya katılan gruplar kendi içlerinde yaşları göze alınarak aynı şekilde dört gruba ayrılıp değerlendirildiğinde; HBV ile karşılaşmamış bireylerden ve kronik hepatit B hastalarından oluşan gruplarda STING ekspresyon düzeyinin yine 31-40 yaş aralığında en yükseğe ulaştığı, HBV'ye karşı doğal bağışıklardan oluşan grupta ise en yüksek düzeye 41-50 yaş aralığında ulaştığı gözlemlenmiştir. Gruplar arasındaki bu farklılığın tam anlamıyla aydınlatılabilesinin kapsamlı bir çalışmayla mümkün olacağına inanmaktayız. Bu çalışmada hasta ve bağışık grubun HBV ile karşılaşma yaşlarına ait sağlıklı bilgiye ulaşılamamıştır. Bu nedenle karşılaşma yaşı bilinen bireylerde klinik seyrin takip edildiği ve bu süreçte STING ekspresyonunun izlendiği çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca, enfeksiyonun kronikleşme oranlarının farklılık gösterdiği yenidoğan ve çocukluk yaş gruplarını da içeren kapsamlı bir çalışma ile STING ekspresyonunun HBV enfeksiyonunun klinik seyrine etkisinin belirginleştirilebileceğini düşünmekteyiz.

Hepatit B enfeksiyonunun doğal seyrine etki eden faktörler arasında konağın cinsiyeti de yer alır. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda genel olarak kadın hepatit B taşıyıcılarındaki viral yükün erkek taşıyıcılara oranla daha düşük olduğu, karaciğerlerindeki NK hücre yoğunluğunun kadın hastalarda erkek hastalardan yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Östrojenin, HBV gen ekspresyonunun önemli bir uyarıcısı olan Enh I elementinin aktivitesini azaltarak HBV'nin replikasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca, kadın hepatit B hastalarında HSK gelişme olasılığının da erkek hastalara oranla daha düşük olduğu ortaya konmuştur^{27,28}. Cinsiyet ile hepatit B'nin klinik seyri arasındaki bu ilişkiden yola çıkarak çalışmamıza katılan gönüllüler tanı fark etmeksizin kadın-erkek olarak iki gruba ayrılıp STING ekspresyon düzeyi ortalamaları değerlendirilmiştir. Kadın katılımcıların STING ekspresyon düzeyi ortalamalarının 0.087 ± 0.027 , erkek katılımcıların ortalamalarının 0.073 ± 0.024 olduğu gözlemlenmiştir. Kadınlardaki STING ekspresyon düzeyi ortalamaları erkeklerden yüksek bulunmakla birlikte yapılan istatistiksel analiz sonucunda iki grubun STING ekspresyon düzeyi ortalamaları arasında anlamlı bir fark görülmediği tespit edilmiştir ($p= 0.560$). Çalışmaya katılan gruplar kendi içlerinde cinsiyetleri göz önüne alınarak incelendiklerinde de tüm gruplarda kadınların STING ekspresyon düzeyi ortalamalarının erkeklerinkinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca HBV'ye karşı doğal bağışıklardan oluşan grupta ise bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p= 0.03$). Literatür araştırmalarına göre çalışmamız cinsiyet ile STING ekspresyon düzeyi ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamızın bu açıdan konu ile ilgili ileride yapılacak geniş kapsamlı çalışmalara ışık tutacağı kanaatine varılmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda grupların temel STING gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmış, istatistiksel analiz sonucunda anlamlı bir fark bulunmamasına karşın HBV'ye karşı doğal bağışık grubun bazal STING gen ekspresyon düzeyleri kronik hepatit B'li hasta grubundan yaklaşık %10 daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, örneklem hacminin

daha geniş tutulduğu ve bireylerin STING gen polimorfizminin irdelendiği çalışmaların STING'in HBV immünopatogenezindeki rolünün açıklanmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Bu kapsamdaki çalışmaların kronik hepatit B tedavisinde, STING agonistleri ile doğal immüneyi aktifleştirecek olası farmakolojik ajan geliştirme çalışmalarına ışık tutabileceğini varsaymaktayız. Ayrıca, hepatit B enfeksiyonunun akut dönemindeki hastalarda STING gen ekspresyon düzeylerinin ölçülmesi ve hastaların klinik seyri arasındaki ilişkinin izlenmesi ve ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasının da STING proteininin HBV'ye karşı doğal bağışıklık gelişimindeki olası katkısının ortaya konmasında yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Deny P, Zoulim F. Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58(4):245-53.
2. Guidotti LG, Isogawa M, Chisari FV. Host-virus interactions in hepatitis B virus infection. *Curr Opin Immunol* 2015;36:61-6.
3. Hui CK, Lau GK. Immune system and hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 2005;34(1):44-8.
4. Pei RJ, Chen XW, Lu MJ. Control of hepatitis B virus replication by interferons and Toll-like receptor signaling pathways. *World J Gastroenterol* 2014;20(33):11618-29.
5. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2018. Hepatitis B virus: Clinical manifestations and natural history; (Alıntılanma tarihi: 28.03.2017); <http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-natural-history-of-hepatitis-b-virus-infection>.
6. Dhanwani R, Takahashi M, Sharma S. Cytosolic sensing of immuno-stimulatory DNA, the enemy within. *Curr Opin Immunol* 2018;50:82-7.
7. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon dependent innate immunity. *Nature* 2009;461(7265):788-92.
8. Barber GN. STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. *Trends Immunol* 2014;35(2):88-93.
9. Burdette DL, Vance RE. STING and the immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol* 2013;14(1):19-26.
10. Guo F, Han Y, Zhao X, Wang J, Liu F, Xu C, et al. STING agonists induce an innate antiviral immune response against hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(2):1273-81.
11. Song S, Peng P, Tang Z, Zhao J, Wu W, Li H, et al. Decreased expression of STING predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Sci Rep* 2017;7:39858.
12. Yeşilyurt E, Aslan SÖ, Kalkancı A, Fidan I, Oğan MC, Kuştımur S. Ertapenem ve doripenemin insan periferik kan mononükleer hücrelerinden sitokin salınımına etkisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2013;43(2):50-5.
13. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* 2013;3(3):71-85.
14. Seng LG, Daly J, Chang KC, Kuchipudi SV. High basal expression of interferon-stimulated genes in human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells contributes to influenza A virus resistance. *PLoS One* 2014;9(10):e109023.
15. Liu Y, Li J, Chen J, Li Y, Wang W, Du X, et al. Hepatitis B virus polymerase disrupts K63-linked ubiquitination of STING to block innate cytosolic DNA-Sensing pathways. *J Virol* 2015;89(4):2287-300.
16. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signaling. *Nature* 2008;455(7213):674-8.

17. Liu Y, Goulet ML, Sze A, Hadj SB, Belgnaoui SM, Lababidi RR, et al. RIG-I-mediated STING upregulation restricts Herpes Simplex Virus 1 infection. *J Virol* 2016;90(20):9406-19.
18. Banete A, Seaver K, Bakshi D, Gee K, Basta S. On taking the STING out of immune activation. *J Leukoc Biol* 2018;103(6):1189-95.
19. Guo F, Tang L, Shu S, Sehgal M, Sheraz M, Liu B, et al. Activation of stimulator of interferon genes in hepatocytes suppresses the replication of hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(10):e00771-17.
20. Liu S, Zhao K, Su X, Lu L, Zhao H, Zhang X, et al. MITA/STING and its alternative splicing isoform MRP restrict hepatitis B virus replication. *PLoS One* 2017;12(1):e0169701.
21. Chang J, Guo JT. Treatment of chronic hepatitis B with pattern recognition receptor agonists: current status and potential for a cure. *Antiviral Res* 2015;121:152-9.
22. Wu CS, Zhao Q, Zhang J, Wang JW, Qian Y, Fan YC, et al. Methylation status of the stimulator of interferon genes promoter in patients with chronic hepatitis B. *Medicine* 2018;97(52):e13904.
23. Xie Q, Shen HC, Jia NN, Wang H, Lin LY, An BY, et al. Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes Infect* 2009;11(4):515-23.
24. Chen Z, Cheng Y, Xu Y, Liao J, Zhang X, Hu Y, et al. Expression profiles and function of Toll-like receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clin Immunol* 2008;128(3):400-8.
25. Yi G, Brendel VP, Shu C, Li P, Palanathan S, Cheng Kao C. Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides. *PLoS One* 2013;8(10):e77846.
26. Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2014;384(9959):2053-63.
27. Montella M, D'Areola G, Crispo A, Capunzo M, Nocerino F, Grimaldi M, et al. Role of sex hormones in the development and progression of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Int J Endocrinol* 2015;2015:854530.
28. Macek JZ, Decaens T, Marlu A, Marche H, Jouvin-Marche E, Marche PN. Sex differences in spontaneous degranulation activity of intrahepatic natural killer cells during chronic hepatitis B: Association with estradiol levels. *Mediators Inflamm* 2017;2017:3214917.