

T.C.
MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KRONİK HEPATİT C HASTALARINDA DOĞAL SEYRİN
VE TEDAVİ YANITININ DEĞERLENDİRİLMESİNDE
İNERLÖKİN 28B'NİN DEĞERİ

Dr. Özgün İYİGÜN

İÇ HASTALIKLARI
UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL

2012

**T.C.
MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KRONİK HEPATİT C HASTALARINDA DOĞAL SEYRİN
VE TEDAVİ YANITININ DEĞERLENDİRİLMESİNDE
İNERLÖKİN 28B'NİN DEĞERİ**

Dr.Özgün İYİGÜN

**TEZ YÖNETİCİSİ
Prof.Dr. A.Melih ÖZEL**

**İÇ HASTALIKLARI
UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL

2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	ii
ŞEKİLLER VE TABLOLAR	iii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
GEREÇ VE YÖNTEM	14
BULGULAR	18
TARTIŞMA	24
ÖZET	30
İNGİLİZCE ÖZET	32
KAYNAKLAR	34

TEŞEKKÜR

Hekimlik mesleğinin öğrenilmesinde ara kademelerden biri olan İç Hastalıkları uzmanlık eğitiminin sonuna gelmiş bulunuyorum. Bu süreçte mesleğimin tüm detaylarını öğrenmek ve hastalarımaya fayda sağlayabilmek için üzerime düşeni yapmaya çalışırken desteğini hissettiğim herkese teşekkür etmek isterim.

İç Hastalıkları uzmanlık eğitim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Selim Nalbant'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimi sürecimde ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan her zaman onur duyduğum, tecrübelerinden yararlanırken ve zorlu tez hazırlığım sırasında göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, tez danışmanım, Sayın Prof.Dr.A.Melih Özel'e teşekkürü borç bilirim.

Fikirleri ve yönlendirmeleriyle beni düşünmeye, çalışmaya, araştırmaya yönelten, ilgisi ve bilgisi ile yol gösterici olan Sayın Prof.Dr. Oya Uygur Bayramiçli'ye teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık öğrenciliğim sırasında bilgi ve beceri kazanmamda emeği geçen klinik hocalarım Sayın Prof.Dr. M.Yaşar Tülbek'e, Sayın Prof.Dr. Orhan Türken'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülbüz Sezgin'e ve Sayın Uzm.Dr.Eşref Özer'e teşekkür ederim.

Bu süreçte yaptığım rotasyonlar sırasında bilgi, beceri ve deneyimlerini benimle paylaşan sayın hocalarım Prof.Dr.Attila Saygı, Prof.Dr.Bahadır Dağdeviren, Doç.Dr. Rahmi Çubuk, Yrd.Doç.Dr. Tayfun Gürol, Yrd.Doç.Dr. M.Serdar Yılmaz, Yrd.Doç.Dr. Alper Aydın, Yrd.Doç.Dr. Ender Levent, Yrd.Doç.Dr. Nesrin Sarıman'a, ve Yrd.Doç.Dr. Aslı Karadeniz'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı proje aşamasından itibaren destekleyen, moleküler patoloji, genetik ve moleküler biyoloji bilgilerini cömertçe benimle paylaşan, verilerin değerlendirilmesinde büyük katkı sağlayan patolog Sayın Prof.Dr.Hüseyin Baloğlu'ya da büyük teşekkür borçluyum.

Eğitim sürecim boyunca birbirimize destek olduğumuz, acı tatlı çok şey paylaşarak aile ortamı yarattığımız tüm uzmanlık öğrencisi arkadaşlarıma; karşılıklı sevgi ve saygı içerisinde birlikte çalışırken mutluluk duyduğum, desteklerini hep hissettiğim tüm hemşire, intern ve uzman doktor arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Son olarak bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan ve bu uğurda hiç bir fedakarlığı esirgmeden her zaman yanımda olduklarını hissettiren canım annem, kıymetli babam, sevgili ablam ve enişteme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Özgün İYİGÜN

KISALTMALAR

HCV	: Hepatit C Virüsü
IL-28B	: İnterlökin 28B
SNP(s)	: Single nucleotide polymorphism(s) (tek nükleotid polimorfizm)
IFN	: İnterferon
HSK	: Hepatosellüler karsinom
HCV-RNA	: Hepatit C Virüsü Ribonükleik Asit
ELİSA	: Enzim işaretli immunassay (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
KVY	: Kalıcı virolojik yanıt
RNA	: Ribonükleik Asit
EVY	: Erken virolojik yanıt
IFNλ	: İnterferon lambda
GWA	: Genome-wide association
HVY	: Hızlı viral yanıt
PegIFN	: Peginterferon
RBV	: Ribavirin
kb	: Kilobaz
HRM	: Yüksek rezolüsyonlu erime analizi (high resolution melting)
TVY	: Tedavi sonu viral yanıt

ŞEKİLLER ve TABLOLAR

- Şekil – 1** :Dünyada HCV sıklığı
- Şekil – 2** :HCV genotipleri ve alt tipleri
- Şekil – 3** :Genotip-1 hastalarda tedavi yaklaşımı
- Şekil – 4** :IL28-B genomuna genel bakış
- Şekil – 5** :Yüksek-düşük viral yük ve tedavi ile gelişen KVV-HVV ilişkisi
- Şekil – 6** : Farklı etnik gruplarda rs12979860 C/T allel sıklığı
- Şekil – 7** : Rs12979869 C/C – T/T – C/C varyantları ve HCV spontan klirensi
- Şekil – 8** : Hepatit C virüsü genotip-1 hastalarda kalıcı viral yanıt ile allel sıklığı arasındaki ilişki
- Şekil – 9** : PegIFN / RBV ile tedavi edilen genotip 1 hastalarda KVV belirleyici unsurlar
- Şekil – 10**: Rs12979860, rs8099917 C/C - T/T taşıyan hastalar ve kalıcı viral yanıt oranları
- Şekil – 11**: Viral ve non-viral nedenlere bağlı HCC ve siroz olgularında C/C genotipi taşıma oranları
- Şekil – 12** : Olguların gene scanning sonuçları (normalized melting curve)
- Şekil – 13** : Olguların gene scanning sonuçları (normalized and Temp-shifted difference-plot)
- Şekil – 14** : Olguların klinik özellikleri ile SNP profillerinin karşılaştırılması
- Tablo – 1** : KVV’i olumsuz etkileyen konağa ve virüse ait faktörler
- Tablo – 2** : Real-time PCR için kullanılan primerler
- Tablo – 3** : HRM çalışma protokolü
- Tablo – 4** : LightCycler 480 ile HRM analizi için optimize edilmiş döngü protokolü
- Tablo – 5** : “Gene-scanning” analizinde kullanılan parametrelerin önceden belirlenen değerleri
- Tablo – 6** : Çalışma Hastalarının Demografik Özellikleri
- Tablo – 7** : Çalışmaya Alınan Hastaların Klinik Özellikleri
- Tablo – 8** : Olguların klinik özellikleri ile SNP profillerinin karşılaştırılması
- Tablo – 9** : Nüks gözlenen ya da yanıtız hastalar ile EVV, TVV, KVV olan hastaların genotipik dağılımları

1. GİRİŞ

Kronik hepatit C virüs (HCV) infeksiyonunun seyri sırasında konakçıya ait genetik faktörlerin, hastalığın doğal seyri ve tedavi yanıtı üzerinde rol oynayabilecekleri uzun zamandır üzerinde durulan ve araştırılan bir konu olmakla birlikte, bununla ilgili objektif sonuçlar çok yakın zamana kadar elde edilebilmiş değildi. Yakın zamanda yapılan genetik çalışmalar Hepatit C virüsü genomunda interlökin 28B (IL-28B) genine yakın alanda saptanan tek nükleotid polimorfizminin (single nucleotide polymorphism – SNP), özellikle genotip-1 ile infekte bireylerde, tedavi cevabı üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur (1,2).

Bu çalışmaların ardından yayınlanan çok sayıda makalede, IL-28B genine yakın alanda saptanan SNP'nin yalnızca tedavi yanıtı üzerinde değil, aynı zamanda virüsün spontan klirensinin sağlanması üzerinde de etkili olduğunu düşündüren sonuçlar elde edilmiştir (3).

Ülkemizde kronik hepatit C olgularının büyük bölümünün genotip-1 olduğu ve bu grup hastalarda tedavi yanıtının diğer genotiplere göre daha kötü olduğu bilinmektedir (4). IL-28B genine yakın alanda saptanan SNP'nin, kronik hepatit C hastalığının bu hastalardaki doğal seyri ve tedavi yanıtı üzerine olan etkisinin yaygın olarak gösterilebilmesi ile bireye özgü tedavi yöntemleri gibi yeni yaklaşımların geliştirilmesi söz konusu olabilecektir.

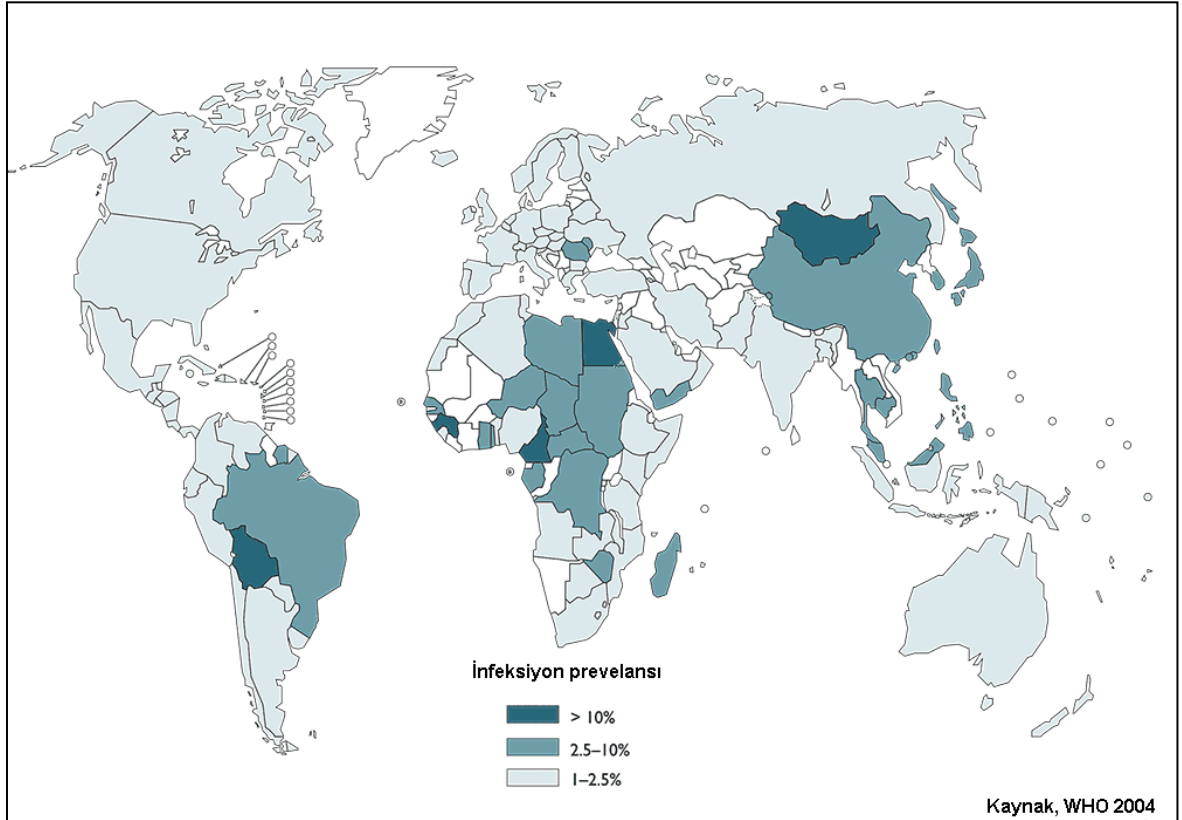
Bu durum tedavide kullanılan ilaçların (interferon [IFN] ve ribavirin) yan etkileri ve maliyetleri düşünüldüğünde, hastalara gereksiz ilaç uygulanmasının önlenmesine ve maliyet-etkin tedaviler geliştirilebilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmamızda, tamamı genotip-1 olan kronik HCV hastalarında IL-28B polimorfizmini ve farklı klinik seyirlere sahip hastaların bu farklılıklarının IL-28B polimorfizmi ile ilişkisini (IL-28 B polimorfizminin hastalığın doğal seyri ve tedavi yanıtı üzerine olan etkilerini) araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

HEPATİT C VİRÜS İNFEKSİYONU

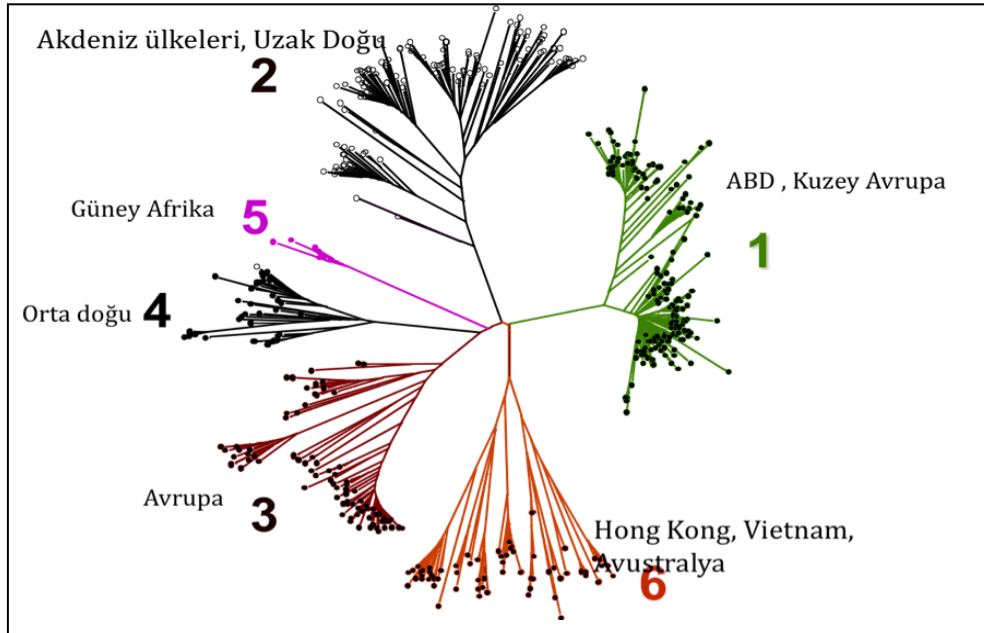
Hepatit C virüs (HCV) infeksiyonu, dünya genelinde toplam 170 – 200 milyon kişiyi etkileyen, bu havuza her yıl 3-4 milyon yeni olgunun eklenmesine neden olan ve kronik karaciğer hastalığının başlıca nedenlerinden birisi olan küresel bir sağlık sorunudur ve karaciğer transplantasyonunun en sık nedenidir (5,6). Dünyada HCV infeksiyonunun ortalama sıklığı %3 civarındadır (6) (Şekil-1). Ülkemiz HCV infeksiyonu açısından orta endemisite bölgesinde yer almaktadır ve ülkemizde yapılan çeşitli kohort çalışmalarına göre HCV sıklığı %1 – %2,4 arasında değişmektedir (7).



Şekil-1: Dünyada HCV sıklığı

HCV infeksiyonunun uzun dönem hepatik etkileri, hafif değişikliklerden kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma (HSK) kadar değişen bir çeşitlilik göstermektedir (8).

HCV'nin genetik yapısı incelendiğinde, 6 genotip ile birlikte 80'den fazla subtipi bulunduğu görülmektedir (4). Genotiplerin dağılımı coğrafi farklılık göstermektedir (Şekil-2). Dünyada en yaygın genotip, genotip-1'dir ve yapılan çalışmalarda ülkemizde görülen hepatit C infeksiyonlarının neredeyse tamamına yakını genotip-1 ile olmaktadır (7).



Şekil-2: HCV genotipleri ve alt tipleri (5 numaralı kaynaktan alınarak uyarlanmıştır).

Belli genotiplerin hastalığın klinik seyri ve tedaviye yanıt üzerinde rolleri olduğu bilinmektedir. HCV genotiplerinin interferon tedavisine yanıtta başlıca belirleyici olduğu ve bu nedenle genotipin kronik HCV'li hastalarda takip ve tedavinin odak noktasını oluşturduğu konusunda genel bir görüş birliği bulunmaktadır (9).

Genotip-1 hastaların, genotip-2 ya da genotip-3 ile infekte hastalara göre HCV-RNA(Hepatit C Virüsü Ribonükleik Asit) klirensinin daha az ve interferon (IFN) tedavisine yanıtının daha düşük olduğu bilinmektedir (10).

HCV'nin başlıca bulaş yolu olguların % 50'sinden fazlasında parenteral yoldur. Parenteral olmayan yolla bulaş tanımlanmasına rağmen, % 30 vakada halen bulaş yolu açıklanamamıştır (11).

KRONİK HEPATİT C

Hepatit C'nin doğal seyri büyük değişkenlikler gösterir. Akut infeksiyondan itibaren izleme alınan hastaların %55 - %85'inde kronik infeksiyon gelişirken, bu olguların %5 - %20 kadarında hastalık siroza ilerler (12).

Tanı: Serolojik testler (Anti-HCV tayini), moleküler testler (HCV-RNA), biyokimyasal testler (aminotransferazlar) ve karaciğer biyopsisi tanıda yardımcıdır (13). Serolojik testlerden Anti-HCV tarama testi olarak kullanılır. Anti-HCV aranması, enzim işaretli immunassay (ELISA) yöntemi ile yapılmalı ve Anti-HCV pozitifliği durumunda, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile HCV-RNA varlığı araştırılmalıdır. HCV ile infekte tüm hastalarda tedavi planlanması, dozu ve süresinin belirlenmesi açısından HCV genotiplemesi mutlaka yapılmalıdır (14).

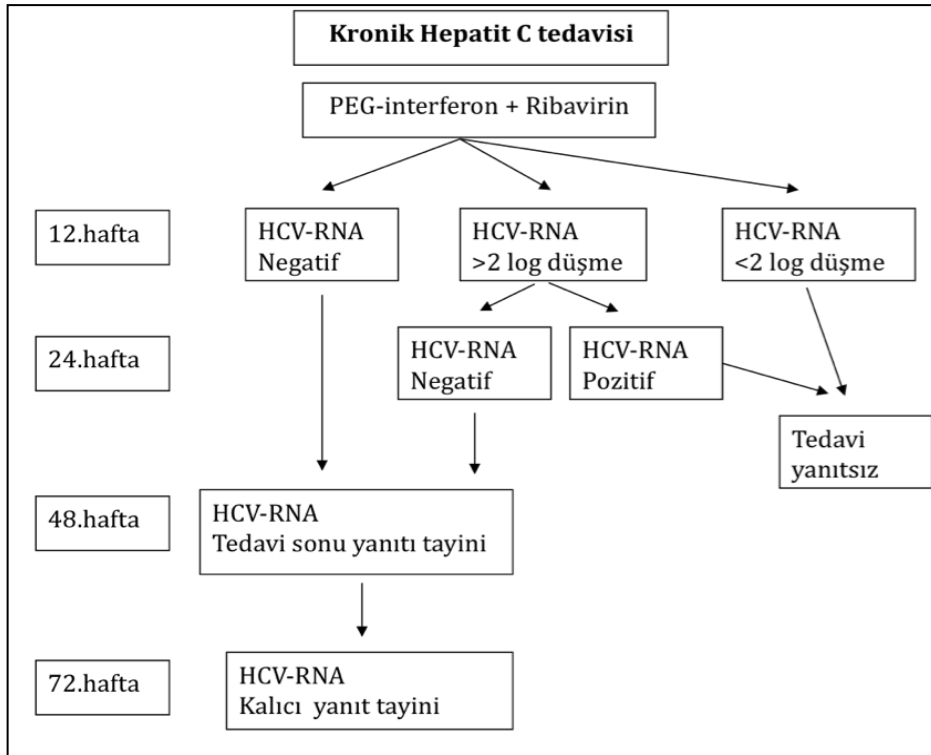
Karaciğer biyopsisi, genellikle kronik HCV infeksiyonu olan hastaların ilk değerlendirilmesinde önerilir. Fibrozis ve nekroinflamasyonun şiddetinin belirlenmesinde altın standarttır. Hepatit C'li hastalarda tedavi öncesi yapılan karaciğer biyopsisi prognozun, tedavinin zamanlamasının ve tedaviye yanıt olasılığının öngörülmesinde ipuçları sağlayabilir (15).

Tedavi: Kronik hepatit C infeksiyonunda antiviral tedavinin amacı, viral replikasyonun baskılanması, kronik hepatitin remisyonunun sağlanması ve bu yolla hastalığın siroz ve hepatosellüler karsinoma (HSK) gibi geç komplikasyonlarının önlenmesidir (16). Bu hedefe infeksiyonun eradikasyonu ile ulaşılabacağından tedaviye cevap HCV-RNA testi ile kontrol edilir. Kalıcı virolojik yanıt (KVY) elde edildiğinde infeksiyonun eradike olduğu kabul edilmektedir. Kalıcı viral yanıt, tedavi sonunda ve tedavinin bitiminden 6 ay sonra serumda duyarlı testlerle HCV-RNA'nın tespit edilememesi şeklinde tanımlanmaktadır. Dolayısı ile tedavide eradikasyon asıl

amaçtır. Eradikasyonun sağlanması ile siroza gidiş yavaşlatılacak / önlenebilecek ve hayat kalitesinde de olumlu bir gelişme elde edilecektir.

1990 yılında 'interferon monoterapisi' ile başlatılan tedavilerden sonra, 1998'de tedaviye ribavirinin eklenmesi ile bu hastaların tedavilerinde daha iyi yanıt alındığı gözlenmiştir (17,18). İzleyen yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar sonunda 'PEG-interferon ve ribavirin kombinasyon tedavisi' kronik hepatit C için standart tedavi olarak uygulanmaya başlanmıştır. Bu tedavi ile genotip-1 hastalarında % 50 - 60, genotip-2 ve genotip-3 hastalarında ise %80 - 90 oranlarında tedavi yanıtlarına ulaşılmıştır (19,20,21).

Kronik Hepatit C'nin güncel tedavisinde kullanılan kombinasyon, pegile interferon- α 2a (180 μ g/haftada bir) veya 2b'nin (1,5 μ g/kg, haftada bir) ribavirin ile kombinasyonudur. HCV genotip-2 ve genotip-3 olgularında ribavirin dozu 800 mg/gün, genotip-1'de ise 1000-1200 mg'dır. Tedavi süresi HCV genotip-1 olgularında 48 hafta, genotip-2 ve genotip-3 olgularında ise 24 haftadır (16,22). Kronik hepatit C'li genotip-1 hastalarda tedavi yaklaşımı Şekil-3' te gösterilmiştir (23).



Şekil-3: Genotip-1 hastalarda tedavi yaklaşımı

Günümüzde yeni tedavi araçları ile hepatit C infeksiyonunun daha yüksek kalıcı viral yanıt elde edebilecek şekilde tedavi çalışmaları sürdürülmektedir. Bu tedavi araçları arasında HCV spesifik serin proteaz inhibitörleri (telaprevir, boseprevir), RNA'ya bağımlı RNA polimeraz inhibitörleri (R1626, R7128), internal ribozomal giriş bölgesi (entry site = IRES) inhibitörleri ve füzyon proteinleri sayılabilir (24).

Kronik Hepatit C tedavisi verilen hastalarda tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi sırasında kullanılan bazı terimlere de göz atmakta yarar olacaktır. Bu terminoloji tedavi başarısının değerlendirilmesinde izlenecek parametrelerin anlaşılmasını kolaylaştıracaktır.

Tedavi verilen hastalarda, tedavi sonrası aminotransferazların normale dönmesi **biyokimyasal yanıt**, HCV-RNA'nın negatifleşmesi **virolojik yanıt**, karaciğerde nekroinflamasyonun azalması ise **histolojik yanıt** olarak adlandırılır. Tedavinin 12. haftasında HCV-RNA'nın negatifleşmesi veya virüs yükünde ≥ 2 log azalma olması **erken virolojik yanıt (EVY)**, tedavi yanıtının tedavinin bitiminden 6 ay sonra da devam ediyor olması ise **kalıcı viral yanıt (KVY)** olarak değerlendirilir (16,20).

KVY, çok sayıda unsur tarafından etkilenmektedir (25). Bu unsurlar, konağa ve konakçıya ait unsurlar olarak iki grup halinde incelenebilir (Tablo-1). Konağa ait unsurlar arasında IL-28B polimorfizminin diğerlerinden daha büyük önem taşıdığına dair çalışmalar mevcuttur (26,27).

Tablo 1. KVY'i olumsuz etkileyen konağa ve virüse ait faktörler

Konağa ait faktörler	Konakçıya ait faktörler
IL-28B polimorfizmi	Genotip-1
İleri derecede karaciğer fibrozu	Tedavi sürecindeki viral kinetik
>40 yaş	
Erkek cinsiyet	
Beden kitle indeksinin artması	
İnsülin direnci	
Hepatosteatoz	
Afrika kökenli Amerikalı olma (IL-28B ile ilişkili olabilir)	

GENOMİK VARYASYON VE HEPATİT C

İnterlökin 28-B (IL-28B)

IL-28B, IL-28A ve IL-29 ile beraber interferon-10 ailesinin alt grubunu oluşturur ve tip III interferonu [(interferon lambda 3 (IFNλ-3)] kodlar. Bu sitokinler viral infeksiyon veya bakteriyel etkileşimleri takiben özellikle dentritik hücrelerden olmakla beraber tüm çekirdekli hücrelerden üretilir ve etkilerini IL-28R1 / IL-10R2 reseptör kompleksi aracılığıyla gösterirler (1,28).

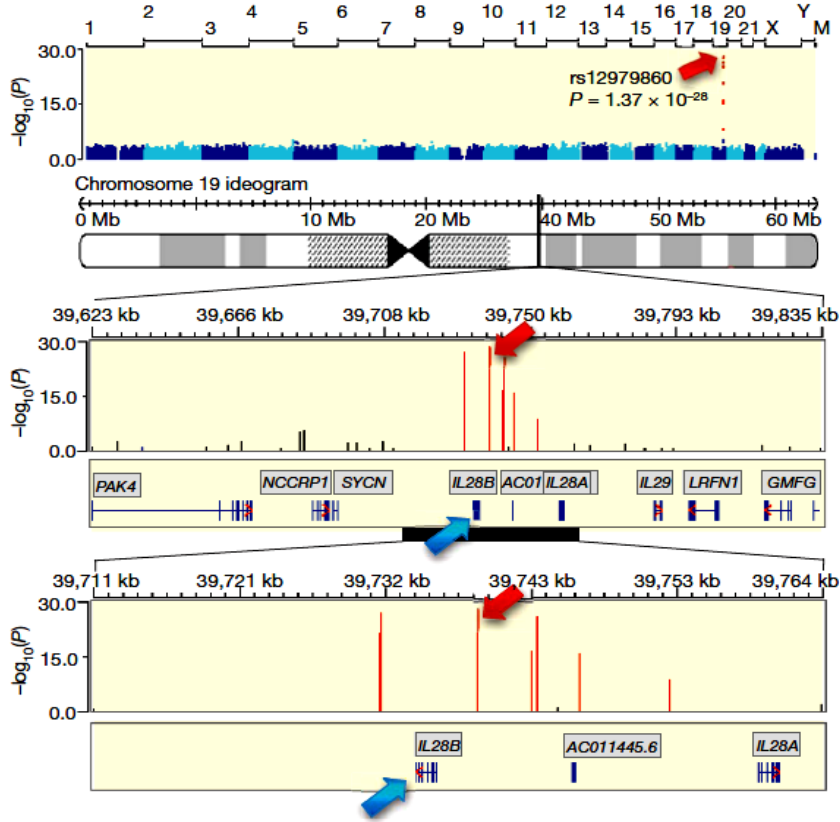
IL-28B ve SNP: HCV infeksiyonunun seyri sırasında konak faktörlerinin incelenmesine yönelik olarak yapılan 'Genome-wide association' (GWA) çalışmalarında, hepatit C tedavisine cevapla ilgili tek nükleotide ait polimorfizmler (single nucleotide polymorphisms –SNPs) bulunmuştur (1,29).

IL-28B'nin tedaviye yanıt ile en fazla ilişki gösteren SNP varyantları rs12979860 ve rs8099917'dir. Bu SNP'ler 19. kromozom üzerinde IL-28B'yi kodlayan genin 3 kilobaz (kb) ve 8 kb yukarısında (upstream) saptanmıştır (1,30). Kalıcı viral yanıtla ilişkili bulunan bu SNP'ler dışında 6 başka SNP daha bulunmaktadır; ancak bunların etkinlikleri rs12979860 etkinliği oluştuğunda ortadan kalkmaktadır (29,30). Sonuçta bu SNP'lerin kalıcı viral yanıtla olan ilişkisi, IL-28B ile ilişkili genomik bölgelerin IFN cevabı ile yakın ilişkili olduğuna işaret etmektedir (1,29).

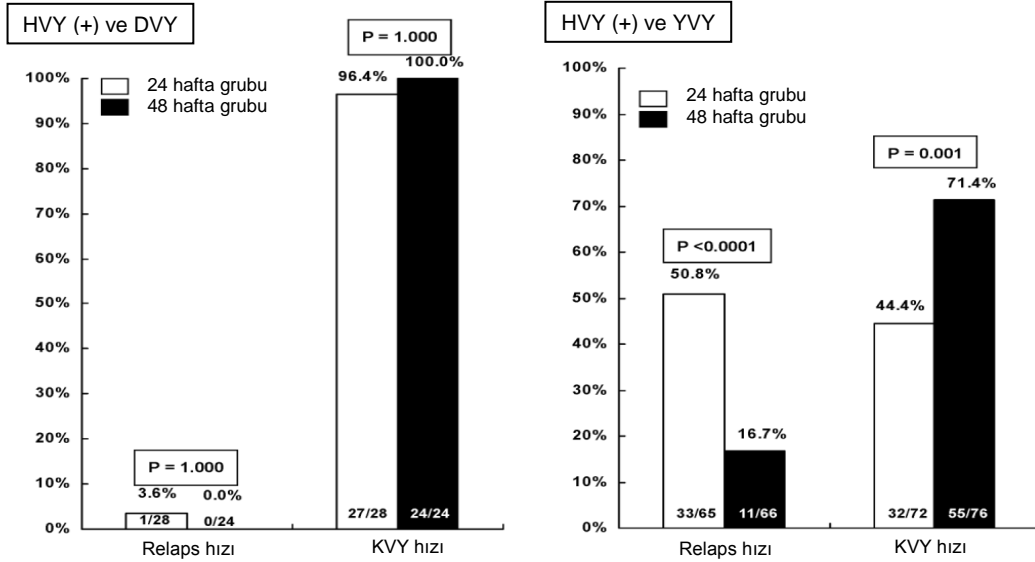
IL-28B genomuna genel bakış Şekil-4'te gösterilmiştir (31).

IL-28B polimorfizminin viral yük ile ilişkisi: IL-28B polimorfizminin HCV-RNA düzeyi ve viral yük üzerine etkileri, çeşitli çalışmalarla araştırılmıştır. Bu çalışmalarda, tedaviye daha iyi yanıt veren rs12979860 C/C varyantı taşıyan hastalarda HCV-RNA düzeyinin daha yüksek olduğu, HCV-RNA düzeyinde en belirgin azalmanın ise yine bu varyantı taşıyan hastalarda meydana geldiği görülmüştür (1,31).

Kronik hepatit C'li hastalarda tedaviye iyi yanıt kriterleri arasında viral yükün fazlalığının da bulunuyor olması nedeni ile IL-28B polimorfizmine bu anlamda hak ettiğinden fazla bir anlam yüklenmemesi gerektiğini düşünenler, yüksek viral yük ile, hızlı ve kalıcı viral yanıt arasındaki anlamlı birlikteliğe işaret etmektedirler. Yüksek viral yük ve düşük viral yük ile kalıcı viral yanıt (KVY) - hızlı viral yanıt (HVY) ilişkisi Şekil-5'te gösterilmiştir (32). Ancak IL-28B polimorfizmi olanlarda viral yükün de fazla olması bu polimorfizme de bağlanabilir.



Şekil-4: IL28-B genomuna genel bakış (31)



Şekil-5: Yüksek (YVY) - düşük (DVY) viral yük ve tedavi ile KVY-HVY ilişkisi (32)

Irklar ve IL-28B polimorfizmi arasındaki ilişki: Hepatit C infeksiyonunun tedaviye yanıtı ırklara özgü farklılıklar göstermektedir. Farklı etnik grupların tedaviye yanıtını inceleyen çalışmalarda rs12979860 C/C alleli taşıma sıklığı yüksek popülasyonlarda tedavi başarı oranının daha yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada Doğu Asyalılarda C/C allel görülme sıklığı %95, Avrupalılarda %75, Afrikalılarda %42 bulunmuştur. Bu bulgular Asyalılarda tedaviye yanıtın yüksek olmasını açıklayabilir (1,27,32).

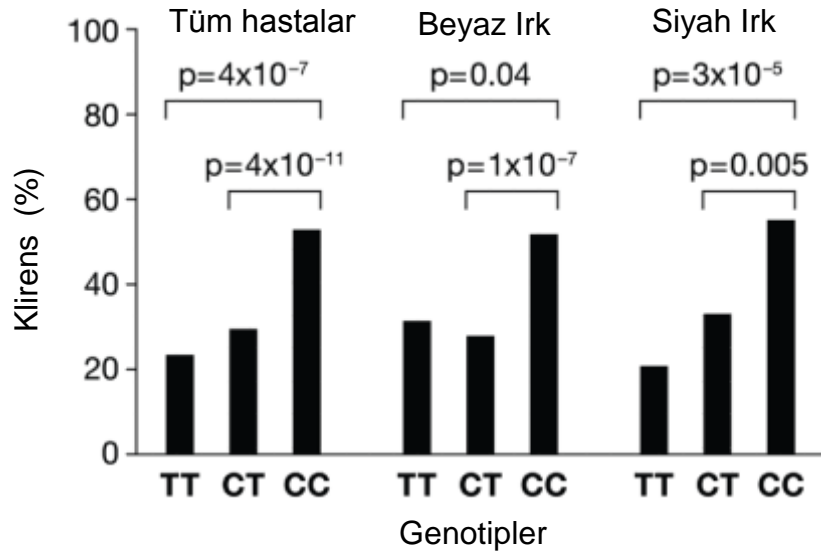
Farklı etnik gruplarda rs12979860 C/C ve C/T allel sıklığı Şekil-6'da gösterilmiştir (27).



Şekil-6: Farklı etnik gruplarda rs12979860 C/T allel sıklığı (27)

IL-28B polimorfizmi ve spontan klirens: IL-28B polimorfizmi akut ve kronik viral hepatitin spontan klirensi üzerinde de etkili bulunmuştur. Spontan klirens tespit edilenlerde C/C allel sıklığı daha yüksek orandadır. C/C allellilerde spontan klirens %52 iken, C/T allellilerde %26, T/T allellilerde ise %22 olmuştur. Bu anlamda HCV infeksiyonunun doğal klirensi ile ilişkili bulunan en önemli ve en güçlü genetik etkinin IL-28B polimorfizmi olduğu ileri sürülmektedir (1,3).

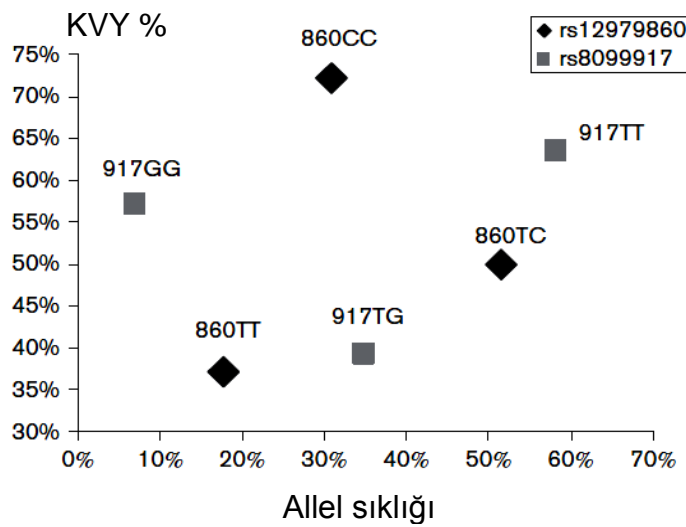
Rs12979869 C/C, T/T, C/C varyantları ve HCV spontan klirensi arasındaki ilişki Şekil-7'de gösterilmiştir (3).



Şekil-7: Rs12979869 C/C – T/T – C/C varyantları ve HCV spontan klirensi (3)

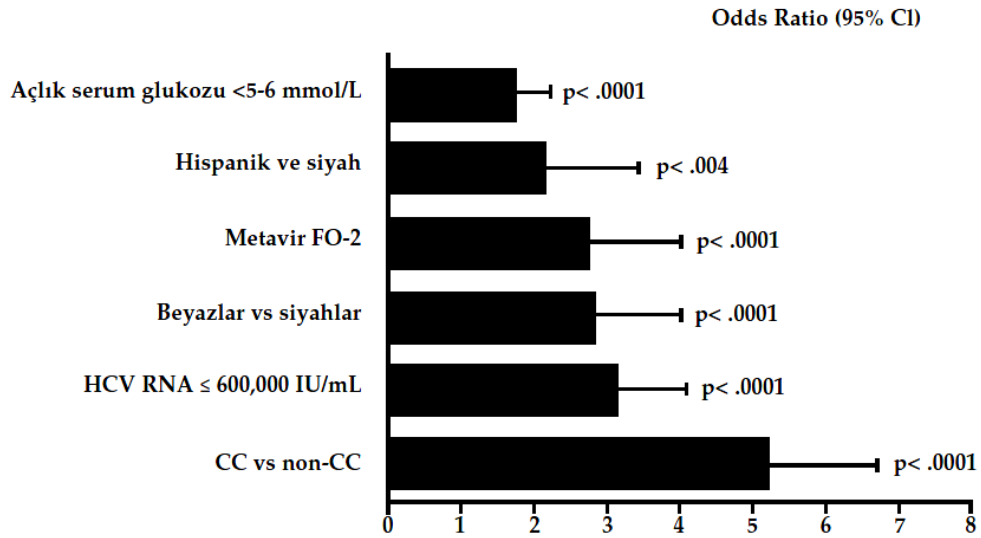
IL-28B polimorfizmi ve genotip-1 olan hastalarda peginterferon / ribavirin tedavisine yanıt: Peginterferon(PegIFN)/Ribavirin tedavisi alan hastalarda tedaviye yanıt oranlarına bakıldığında iki olumlu allel taşıyanlarda (C/C genotip), diğer iki alleli taşıyanlara göre (C/T ve T/T genotip) daha yüksek bulunmuştur. Yapılan farklı çalışmalarda C/C alleli taşıyan genotip-1 hastalarda kalıcı viral yanıt oranı %70'lere kadar ulaşmaktadır (1,2,33).

Genotip-1 hastalarda; rs12979860, rs8099917 allel sıklığı ile kalıcı viral yanıt arasındaki ilişki Şekil-8'de gösterilmiştir (2).



Şekil-8: Hepatit C virüsü genotip-1 hastalarda kalıcı viral yanıt ile allel sıklığı arasındaki ilişki

PegIFN / RBV ile tedavi edilen genotip-1 hastalarda kalıcı viral yanıtın en güçlü belirleyicileri Şekil-9'da görülmektedir. Yapılan çalışmalarda IL-28B'nin KVV ile ilişkisi anlamlı olarak daha belirgin olarak bulunmuştur (27).



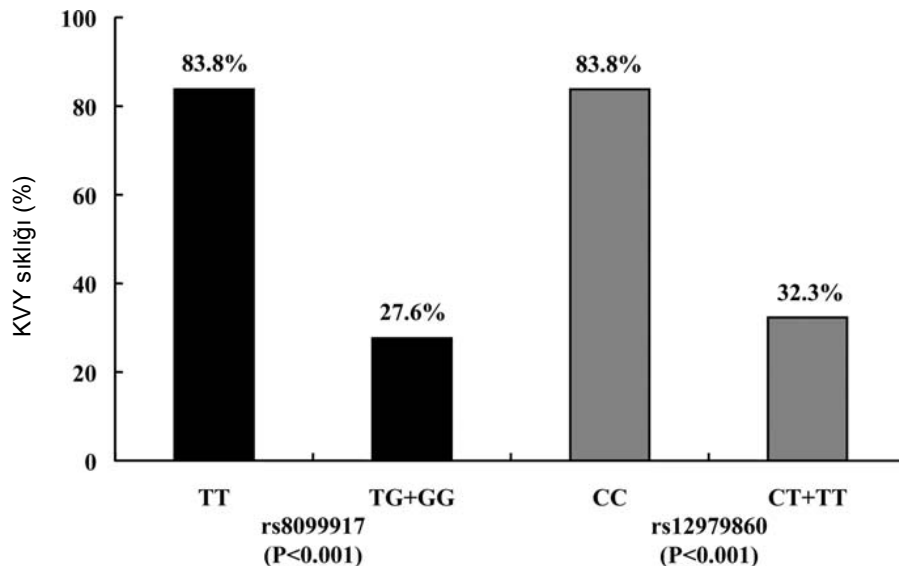
Şekil-9: PegIFN / RBV ile tedavi edilen genotip-1 hastalarda KVV belirleyici unsurlar (27)

IL-28B polimorfizmi ve genotip-2 ve genotip-3 olan hastalarda peginterferon / ribavirin tedavisine yanıt: IL-28B polimorfizmi farklı genotipler üzerinde farklı etki gösterir. Genotip-1 hastaların aksine genotip-2 ve genotip-3 olan hastalarda tedavi sonrası kalıcı viral yanıt üzerine IL-28B polimorfizminin etkinliği sınırlıdır. Tedavi sonrası takiplerde sadece hızlı virolojik yanıt sağlanamayan hasta grubunda kalıcı viral yanıt ile ilişkili bulunmuştur (34,35)

IL-28B polimorfizmi ve proteaz inhibitörü / peginterferon / ribavirin üçlü tedavisine yanıt: Kronik hepatit C hastalarında yüksek viral yük, siyah ırk, ilerlemiş fibrozis varlığı gibi tedaviye yanıtın zor olduğu durumlarda pegIFN / RBV tedavisine telaprevir veya boceprevir eklenmesi ile kalıcı viral yanıt oranlarında artış görülmektedir (36,37,38). Yapılan çalışmalarda Telaprevir + pegIFN / RBV alan hastalarda kalıcı viral yanıt, IL-28B rs12979860 C/C genotipi taşıyan hastalarda %83, T/T genotipi taşıyanlarda %32 olarak saptanmıştır.

Boceprevir çalışmalarında C/C allelilerde KVV %82, T/T allelilerde %55 bulunmuştur (38). Proteaz inhibitörü / peginterferon / ribavirin üçlü tedavisi alan rs12979860, rs8099917 C/C – T/T taşıyan hastalar ve kalıcı viral yanıt oranları Şekil-10'da gösterilmiştir (38).

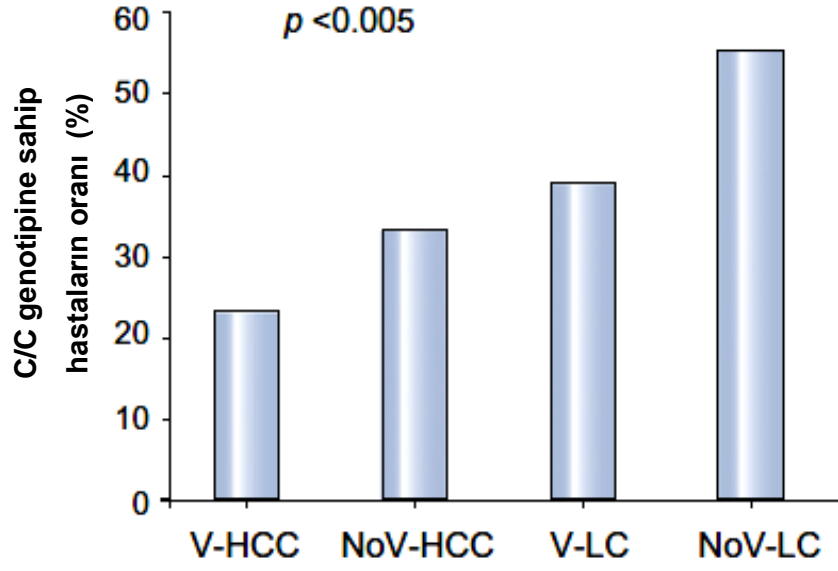
Proteaz inhibitörleri, PegIFN ve Ribavirin ile kombine edildiğinde IL-28B C/C ve T/T genotipine sahip hastalarda belirgin iyileşme ve kalıcı viral yanıtta anlamlı yükselme görülmektedir (36,37,38).



Şekil-10: Rs12979860, rs8099917 C/C-T/T taşıyan hastalar ve kalıcı viral yanıt oranları (38)

IL-28B rs12979860 C/T polimorfizmi ile siroz ve HCC ilişkisi: HCV'ye bağlı siroz hastalarında, hafif şiddette hepatit C infeksiyonu veya HBV ilişkili siroz olan hastalarla karşılaştırıldığında IL-28B rs12979860 T/T genotipi daha görülmektedir (39). Yine benzer şekilde HCC olan hastalarda da T/T genotipi daha sıktır. Şekil-11'de viral ve non-viral nedenlere bağlı HCC ve siroz olgularında C/C genotipi taşıma oranları görülmektedir (39).

Özellikle HCV'ye bağlı siroz olgularında T/T genotipine sahip olanlarda HCC gelişme riskinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (39).



Şekil-11: Viral ve non-viral nedenlere bağlı HCC ve siroz olgularında C/C genotipi taşıma oranları (39) (V-HCC: viral nedenlere bağlı HCC, NoV-HCC: non-viral nedenlere bağlı HCC, V-LC: viral nedenlere bağlı karaciğer sirozu, NoV-LC: non-viral nedenlere bağlı karaciğer sirozu)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı ve Gastroenteroloji Bilim Dalı polikliniklerinde takip edilen hepatit C ile karşılaşmış ve tedavi görmüş ya da görmekte olan hastalarla yürütüldü. Çalışmaya alınan 22 hasta anti-HCV pozitifliği bilinen, kronik HCV tanısı almış, tedavi gören, tedavisi tamamlanmış, tam viral yanıtı ya da kalıcı viral yanıtı olan ya da tedaviye cevapsız veya nüks olarak değerlendirilen hastalardı.

Tez çalışmasının projesi T.C. Sağlık Bakanlığı Dr.Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Bilimsel Araştırma Değerlendirme Kurulu tarafından, kurulun 10 Ocak 2012 gün ve Karar No: 7, B104İSM4340029/1009/6 sayılı kararı Etik Kurul Onayı almıştır.

Hastalar

Çalışmaya alınan hastalar, anti-HCV pozitifliği bilinen, kronik HCV tanısı almış, tedavisi tamamlamış ve tam veya kalıcı viral yanıtı olan, cevapsızlık nedeni ile tedavisi yarım kalan, başarılı bir tedavi ardından nüks eden hastalardı. Hastalar standart tedavi için gerekli olan ölçütler dikkate alınarak, cinsiyete bakılmaksızın seçildiler. Bilinen malign hastalığı olanlar araştırma kapsamı dışında bırakıldı.

Hastaların yaş ve cinsiyet özellikleri, hastalık süreleri, kullandıkları ilaçlar not edildi. HCV-RNA düzeyleri, tedavi öncesi ve sonrası karaciğer fonksiyon testleri ve genotip özellikleri rutin olarak belirlendikten sonra, IL-28B polimorfizmi tetkiki için çalışmaya alındılar.

Çalışmaya alınan hastalarda öncelikle temel biyokimyasal değerlendirmeleri yapıldıktan sonra hepatit C infeksiyonu ile ilgili klinik değerlendirme yapıldı ve tedavinin hangi aşamasında oldukları not edildi. Ardından IL-28B polimorfizmi için gerekli testlere geçildi.

IL-28B polimorfizmi incelemesi:

Çalışmaya alınan hastaların antekubital venlerinden kuru laboratuvar tüplerine alınan kan örnekleri (5-10 ml), 3000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüje edilerek plazmaları ayrıldı. Ayrılan plazma örnekleri, IL-28B polimorfizmi incelenmesi yapılabildiği kadar -20°C'de saklandı.

IL-28B geninin 3 kb yukarısında bulunan rs12979860 polimorfizmine spesifik olduğu bilinen (40) 91 BP-100 nml liyofilize primerler sipariş edilerek hazırlatıldı (*GENOVA Medical – Perpa Ticaret Merkezi B Blok No:649 Kat:6 Okmeydanı-İstanbul*) (Tablo-2).

Tablo- 2: Real-time PCR için kullanılan primerler

<i>Primer adı</i>	<i>Sekans 5' → 3'</i>
<i>IL-28B-F1[forward]</i>	<i>5' TCGTGACTGAACCAGGGAG3'</i>
<i>IL28B-R1[reverse]</i>	<i>5' GGAGTGCAATTCAACCCTG 3'</i>

Tablo-2'de gösterilen rs12979860 polimorfizm alanına özgün primerler BioEdit programı kullanılarak manuel olarak seçildi ve primerlerin spesifitesi Primer-BLAST (NCBI) yazılımının 'Primer pair specificity checking parameters' fonksiyonu kullanılarak kontrol edildi.

Hastalara ait plazma örneklerinden QIAamp DNA Blood Mini Kit (*QIAGEN, Almanya-Cat No:51104*) prosedürüne uygun olarak genomik DNA'lar ekstrakte edildi. Ekstrakte edilen DNA konsantrasyonları 53-259 ng / µl arasında değişmekteydi. Her bir olgu için 50 ng/ µl DNA alındı.

Her ne kadar bu lokalizasyonda gözlenen polimorfizmin gösterilebilmesinde standart prosedür DNA sekanslaması ise de, sekanslamanın gerek duyduğu sofistike ekipman ve yüksek maliyeti ortadan kaldırabilmek için son zamanlarda yeni bir "real-time assay" geliştirilmiştir. Bu yöntem PCR sonrası yüksek rezolüsyonlu erime analizi (*post PCR high resolution melting - HRM – analysis*) olarak bilinmektedir ve sekanslamada gerekli olan problemlerin kullanılmasına ihtiyaç göstermemektedir (40). HRM temelli gerçek zamanlı PCR yönteminin hidrolize edilmiş problemlerin kullanıldığı

gerçek zamanlı PCR yöntemine göre bir avantajı daha vardır. Hedef DNA alanına (rs12979860) yakın mesafedeki başka polimorfizmler hidrolize edilmiş problemlerin kullanıldığı gerçek zamanlı PCR çalışmasını beklenmedik şekilde etkileyebilirken, HRM yöntemi bu yakın lokalizasyonlu diğer anormallikleri de saptayarak, olağan dışı erime profiline sahip bu diğer polimorfizmler konusunda çalışmacıyı uyarmaktadır.

HRM analizi mutasyonların saptanabilmesi için nispeten yeni bir yöntemdir (41). Bu analiz inhibe etmeyen, tam sature eden dsDNA boyaları kullanılmaktadır. Tez çalışmamızda ticari olarak elde edilebilen bu tür bir boya seçilmiştir (LightCycler 480 Resolight Dye – Roche Applied Science). Bu boya Light-cycler high-resolution Master kit içerisinde bulunmaktadır. Temin ettiğimiz HRM kiti içerisinde yukarıda sözü edilen boya ve master kit yer almaktadır (*HRM master-mix [Qiagen Kat No: 206542]*).

Ekstrakte edilen DNA örnekleri, primerler ve HRM master-mix içeriği Tablo-3'te tanımlanan protokole göre hazırlanarak bir araya getirildi ve HRM analizi yapıldı.

Tablo-3 : HRM çalışma protokolü

<i>Herbir olgu için*</i>	
DNA	50ng
Forward Primer	10 pmol
Revers Primer	10 pmol
HRM master-mix (Qiagen Kat No: 206542)	5 µl

**Toplam reaksiyon hacmi su ile 10 mcg'ye tamamlandı.*

Kan örneklerine HRM-PCR protokolü uygulandı ve ilk PCR aktivasyon basamağında örnekler 5 dk süre ile 95°C'ye kadar ısıtılarak "Hot StarTaq Plus DNA Polimeraz" aktivasyonu sağlandı. HRM için optimize edilmiş PCR protokolü Tablo-4'te gösterilmiştir.

Protokol uygulandıktan sonra "Gene-scanning analysis" yazılımı kullanılarak veriler elde edildi. İnceleme parametreleri Tablo-5'te gösterildiği şekilde belirlendi. Normalize edilen erime eğrilerinde birbirinden anlamlı farklılık gösteren C/C, C/T, T/T varyantların varlığı araştırıldı.

Tablo-4 : LightCycler 480 ile HRM analizi için optimize edilmiş döngü protokolü*

Step	Time	Temp.	Additional comments
Initial PCR activation step	5 min	95°C	Important: Choose detection format: SYBR Green I/HRM Dye HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase is activated by this heating step
3-step cycling:			Important: Optimal performance is only assured using these cycling conditions
Denaturation	10 s	95°C	
Annealing	30 s	55°C	
Extension	10 s	72°C	Activate "single" fluorescence data acquisition. Suitable for PCR products up to 350 bp. For PCR products >350 bp, use 1 s extension time per 25 bp of PCR product length.
Number of cycles	45		10–50 ng template DNA or 10–50 pg microbial DNA
	50		1–9 ng template DNA or 1–9 pg microbial DNA
HRM			Analysis mode: Melting curve
	1 s	65°C*	
		95°C*	Continuous fluorescence data acquisition. Ramp rate: 0.02°C/s 25 acquisitions per second
Cooling	1 s	40°C	Cooling samples after HRM

*el kitabından alınmıştır.

Tablo-5: "Gene-scanning" analizinde kullanılan parametrelerin önceden belirlenen değerleri

Kanal	465-510
Renk kompensasyonu	Kapalı
Program adı	Yüksek rezolüsyonlu erime
Standart ayarlar	Çalışma sırasında kullanılan önceden belirlenmiş ayarlar
Sensitivite	0,30
Eşik değeri (zaman kayması)	1.00 sn
Erime öncesi ısı	77,47-77,95
Erime sonrası ısı	81,88 - 82,88

İstatistiksel İncelemeler

Çalışmanın istatistiksel değerlendirilmesi yapılırken parametrik değerlerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U test, non-parametrik değerlerin karşılaştırılmasında ise Students t-testi ile Ki kare test ve gerektiğinde Fisher'in exact testi uygulandı.

Anlamlılık her parametre için $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bu tez çalışması, Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı ve Gastroenteroloji Bilim Dalı polikliniklerinde hepatit C nedeni ile takip edilen hastalarla yürütülmüştür. Çalışmaya alınan 22 hasta anti-HCV pozitifliği bilinen, kronik HCV tanısı almış, tedavi gören, tedavisi tamamlanmış, tam viral yanıtı ya da kalıcı viral yanıtı olan ya da tedaviye cevapsız veya nüks olarak değerlendirilen hastalardı.

Çalışmaya 15 kadın, 7 erkek toplam 22 hasta dahil edilmiştir. Hastaların tamamı PEG-IFN / RBV ile tedavi görmüş ya da görmekte olan hastalardı. Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo-6'dadır. Olguların yaşları 30 ile 80 yıl arasında değişmekteydi (*ortalama 53,6 ± 11,4 yıl*). Kadın ve erkekler arasında yaş dağılımı açısından istatistiksel farklılık gözlenmedi (sırası ile $53,7 ± 11,9$ ve $53,4 ± 11,1$, $p>0,05$).

Hastaların tedavi süreçlerindeki durumları ve klinik bazı özellikleri Tablo-7'de gösterilmiştir. Hastaların tamamında hepatit C virüs enfeksiyonu genotip-1 ile oluşmuştur (3 erkek hastada 1a diğer hastaların tamamında 1b genotipi gözlemlendi).

Çalışmaya alınan 22 hastanın 5'i daha önce tedavi almış, takipleri sırasında nüks saptanması üzerine yeniden tedavi başlanan hastalardı. Bunların hepsinde tedavi sonu viral yanıt elde edilmiş ancak sonra nüks etmişlerdi.

Hastalardan 1' inde tedaviye yanıt alınmakla beraber (EVY) (HCV-RNA düzeyi belirgin azaldı) yan etkiler nedeni ile tedavi dördüncü ayda sonlandırıldı; 7 hasta ilk kez tedavi almaktaydı ve hepsinde erken virolojik cevap elde edildi. Bu hastaların tedavisi halen sürmektedir. Bir hasta, 16. haftada HCV-RNA düzeyinde yeterli azalma saptanmadığı için yanıtı kabul edilerek, tedaviye son verildi.

Tedavi verilen diğer 8 hastadan 7'sinde kalıcı viral yanıt elde, 1 hastada da tedavi sonu viral yanıt elde edildi. Bu hastaların takipleri halen sürmektedir.

Tablo - 6: Çalışma Hastalarının Demografik Özellikleri

	Toplam	Kadın	Erkek	
n	22	15 (%68,2)	7 (%31,8)	
Yaş	30 - 80	30 - 80	38 - 70	
Ortalama ± SD	53,6 ± 11,4	53,7 ± 11,9	53,4 ± 11,1	*P > 0,05

* Student t test, P=0,964

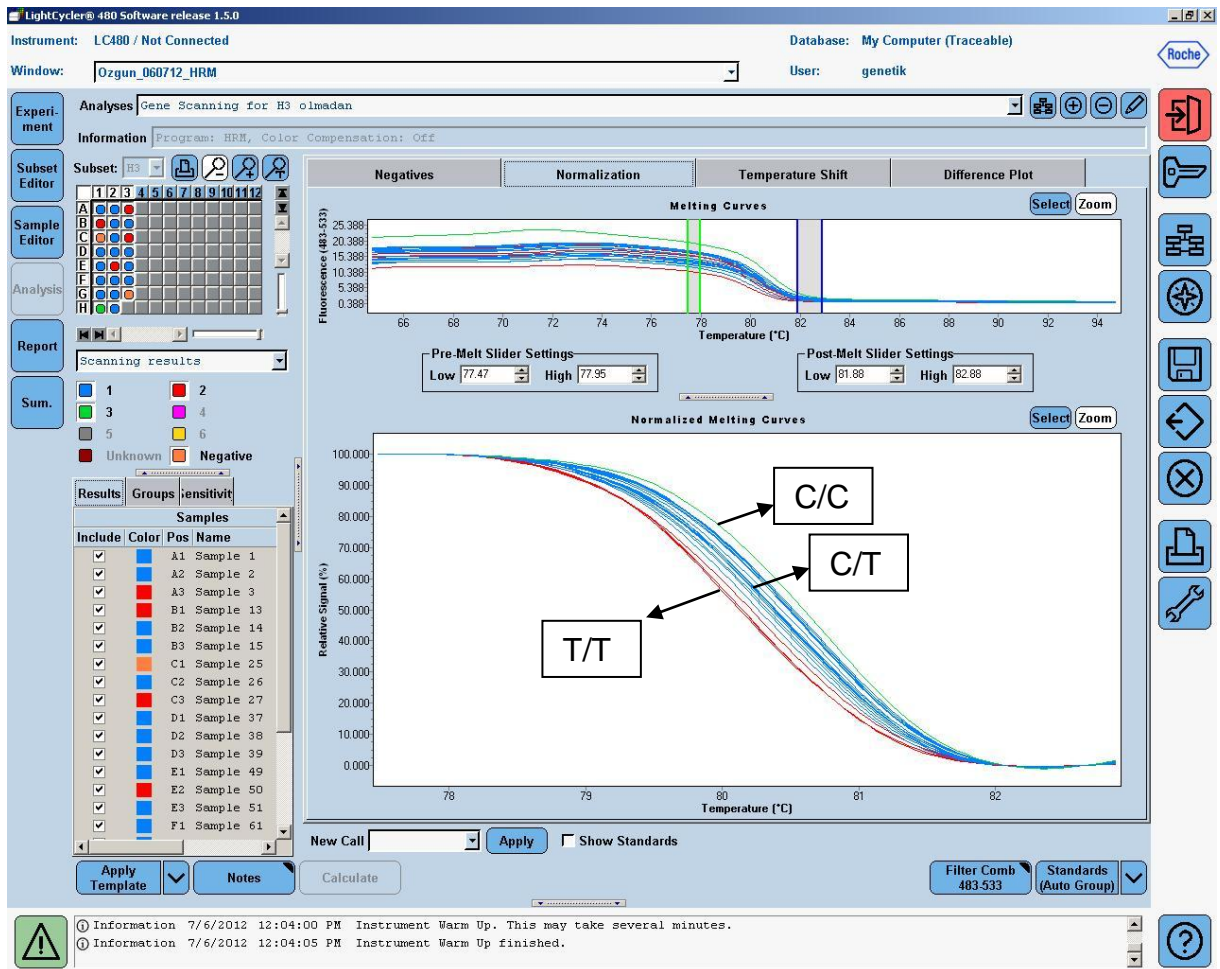
Tablo - 7: Çalışmaya Alınan Hastaların Klinik Özellikleri

S.No	Adı	Soyadı	Cinsiyet	Yaş	Genotip	Tedavi cevabı
1	AR	İ	E	52	1b	TVY – nüks
2	A	Y	E	63	1b	TVY – nüks
3	A	K	K	62	1b	EVY – tedavi sürüyor
4	B	U	K	53	1b	TVY – nüks
5	F	Ü	K	62	1b	KVY – takibi sürüyor
6	F	K	K	58	1b	KVY – takibi sürüyor
7	H	G	K	30	1b	KVY – takibi sürüyor
8	İ	Ş	E	70	1a	EVY – tedavi sürüyor
9	İ	M	K	40	1b	KVY – takibi sürüyor
10	I	G	K	80	1b	KVY – takibi sürüyor
11	K	D	E	53	1b	EVY – tedavi sürüyor
12	M	T	E	42	1a	EVY – tedavi sürüyor
13	M	B	K	46	1b	EVY – tedavi sürüyor
14	RR	Ö	E	56	1a	KVY – takibi sürüyor
15	S	C	K	51	1b	EVY – tedavi sürüyor
16	S	K	K	54	1b	TVY – nüks
17	S	T	K	60	1b	KVY – takibi sürüyor
18	S	S	K	48	1b	Yanıtsız – tedavi kesildi
19	S	Ç	K	42	1b	TVY – nüks
20	S	Y	E	38	1b	TVY – takip sürüyor
21	S	E	K	65	1b	EVY – Yan etkiler nedeniyle tedavi kesildi
22	Ş	E	K	54	1b	EVY – tedavi sürüyor

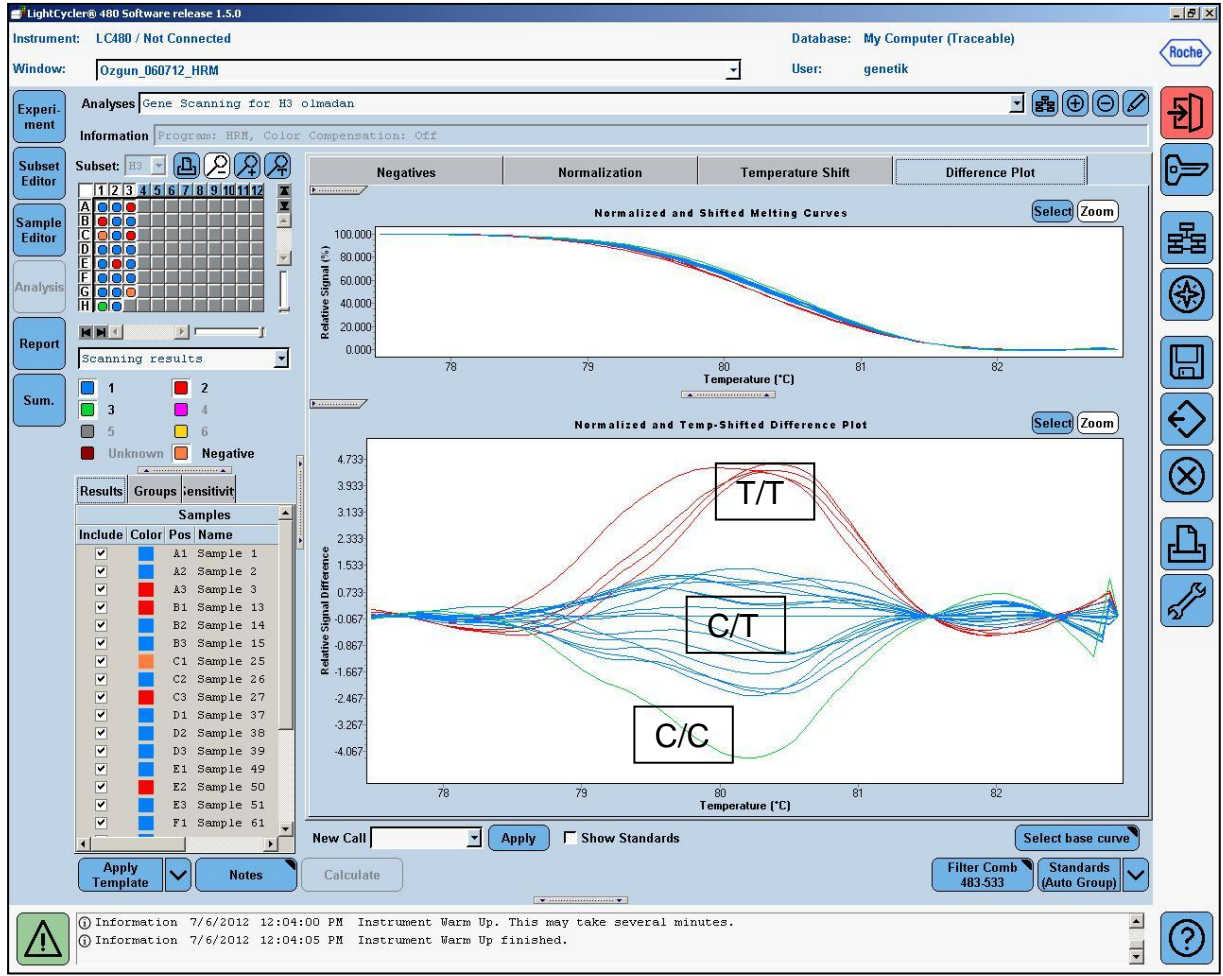
Çalışmaya alınan 22 olgunun gen analiz sonuçları Şekil-12 ve Şekil-13'te görülmektedir. Dağılım eğrilerinde renk ve dağılım farklılığına göre rs12979860 SNP gösteren olgulara ait C/C, C/T ve T/T varyantlarına ait eğriler işaretlenmiştir.

Şekil-12'de gözlenen grafikte, erime ısısının en yüksek olduğu bilinen C/C varyantın en sağda, erime ısısının en düşük olduğu bilinen T/T varyantın en solda ve C/T varyantın ise iki eğri arasında bir normalize erime dağılımı gösterdiği anlaşılmaktadır.

Benzer şekilde Şekil-13'te bu dağılımın ısı ve zamana göre değişimi görülmektedir. Grafiğin üst kısmında dağılım gösteren 4 örnek T/T varyantını, alt kısmında dağılım gösteren 1 örnek C/C varyantını, arada kalan örnekler ise C/T varyantını simgelemektedirler.



Şekil-12: Olguların gen analiz sonuçları (normalized melting curve)



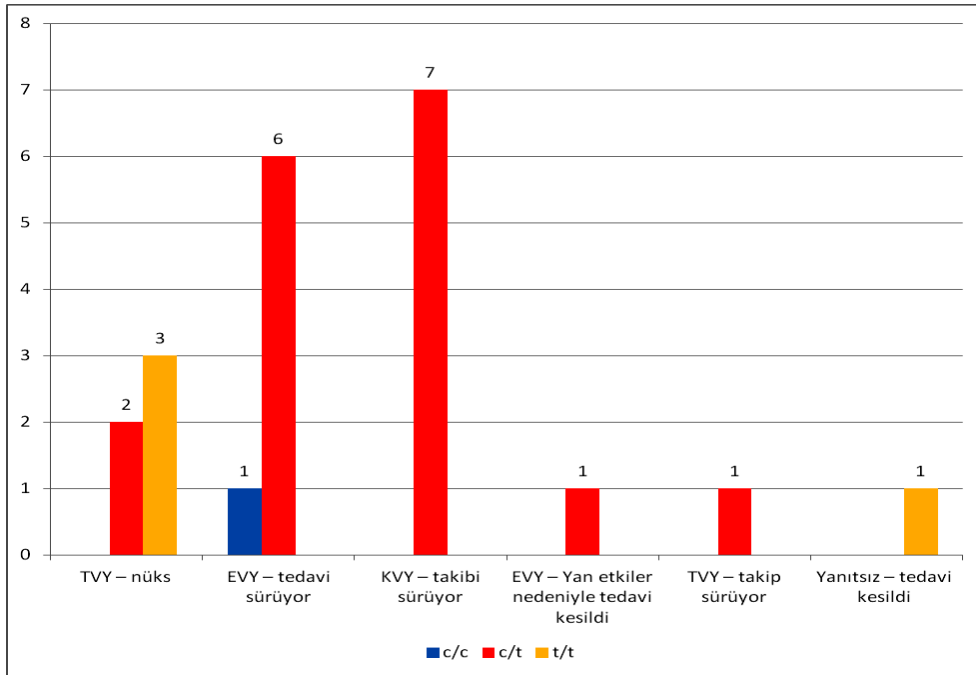
Şekil-13: Olguların gen analiz sonuçları (*normalized and Temp-shifted difference-plot*)

Bu sonuçlara göre çalışmaya alınan 22 hastanın 1'inde (%4,5) C/C varyantı, 17'sinde (%77,3) C/T varyantı ve 4'ünde(%18,2) T/T varyantı olduğu gözlenmiştir.

Olguların klinik özellikleri ile polimorfizm bulguları Tablo-8'de bir araya getirilmiştir. Klinik özelliklere göre saptanan polimorfizm varyantları Şekil-14'te gösterilmiştir. Buna göre tedavi sonu viral yanıtı olup sonradan nüks eden 5 hastanın 3'ünde T/T ve 2'sinde C/T varyantı; ilk kez tedavi alıp erken viral yanıt gözlenen 7 hastanın 1'inde C/C, 6'sında C/T varyantı; takipleri süren kalıcı ve tedavi sonu viral yanıtı 8 hastanın hepsinde C/T varyantı; yanıtı olmayan hastada T/T varyantı; EVY alınmasına rağmen yan etkiler nedeni ile tedavisi sonlandırılan hastada C/T varyantı gözlemlendi.

Tablo- 8: Olguların klinik özellikleri ile SNP profillerinin karşılaştırılması

S.No	Adı	Soyadı	Cinsiyet	Yaş	Tedavi cevabı	Polimorfizm varyantı
1	AR	İ	E	52	TVY – nüks	C/T
2	A	Y	E	63	TVY – nüks	T/T
3	A	K	K	62	EVY – tedavi sürüyor	C/T
4	B	U	K	53	TVY – nüks	T/T
5	F	Ü	K	62	KVY – takibi sürüyor	C/T
6	F	K	K	58	KVY – takibi sürüyor	C/T
7	H	G	K	30	KVY – takibi sürüyor	C/T
8	İ	Ş	E	70	EVY – tedavi sürüyor	C/C
9	İ	M	K	40	KVY – takibi sürüyor	C/T
10	I	G	K	80	KVY – takibi sürüyor	C/T
11	K	D	E	53	EVY – tedavi sürüyor	C/T
12	M	T	E	42	EVY – tedavi sürüyor	C/T
13	M	B	K	46	EVY – tedavi sürüyor	C/T
14	RR	Ö	E	56	KVY – takibi sürüyor	C/T
15	S	C	K	51	EVY – tedavi sürüyor	C/T
16	S	K	K	54	TVY – nüks	C/T
17	S	T	K	60	KVY – takibi sürüyor	C/T
18	S	S	K	48	Yanıtsız – tedavi kesildi	T/T
19	S	Ç	K	42	TVY – nüks	T/T
20	S	Y	E	38	TVY – takip sürüyor	C/T
21	S	E	K	65	EVY – Yan etkiler nedeniyle tedavi kesildi	C/T
22	Ş	E	K	54	EVY – tedavi sürüyor	C/T



Şekil-14: Olguların klinik özellikleri ile SNP profillerinin karşılaştırılması

Bu veriler, saptanan polimorfizm varyantına göre değerlendirildiğinde T/T varyantı olan hastaların (4 hasta) tamamı ya nüks ya da cevapsız grupta idi. C/C varyantlı 1 hasta ilk tedavide ve EVY'lı hasta idi. C/T varyantlı hastaların ikisi nüks tedavi grubunda idi. Geri kalan 15 hasta ise tedavisi ve takibi sürmekte olan EVY, TVY ve KVV'a sahip hastalardı.

İstatistiksel analiz yapılırken daha önce tedaviye cevap vermelerine rağmen nüks olan ve yanıtız hastalar bir grup, EVY, TVY ve KVV olan hastalar ise diğer grup olarak ayrıldı. Bu gruplardaki C/C, C/T ve T/T dağılımları Tablo-9'da görölmektedir.

Tablo-9: Nüks gözlenen ya da yanıtız hastalar ile EVY, TVY, KVV olan hastaların genotipik dağılımları

	C/C ya da C/T	T/T	Toplam
Nüks ya da yanıtız hastalar	2 / 6 (%33,3)	4 / 6 (%66,7)*	6 / 22 (%27.3)
EVY, TVY, KVV'li hastalar	16 / 16 (%100)	0 / 16 (%0)*	16 / 22 (%72.7)
Toplam	18 (%81.8)	4 (%18.2)	22

* P=0.011

İstatistiksel analiz yapıldığında (ki kare test) nüks ya da tedaviye yanıtız hastalarda T/T genotip gözlenme sıklığının (4/6, %66,7), C/C ya da C/T genotipine sahip hastalara (0/16, %0) göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu gözlendi (P<0,05).

5. TARTIŞMA

Kronik hepatit C virus enfeksiyonu için pegIFN ve RBV ile tedavi edilecek olan hastalar arasında kalıcı viral yanıt (KVY) oranının en düşük olduğu grup genotip-1 ile enfekte olan hastalardır. Bu nedenle genetik belirteçlerin prediktif değeri bu hasta grubunda büyük önem taşımaktadır (18,19,21).

Yeni ve daha etkin antiviral tedaviler geliştirildikçe bu genetik değeriendirmeler, hastaların virolojik yanıt potansiyellerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamak yanında, antiviral tedavi başlanıp başlanmaması, hangi antiviral ajanın seçilmesi ve tedavinin ne kadar sürdürülmesi gerektiği gibi konularda verilecek kararı etkileyecek en önemli unsur olacaktır (42,43,44).

Kronik genotip-1 HCV enfeksiyonlu hastalarda tedavi sonuçlarının optimize edilmesindeki güçlükler dikkate alındığında, KVY'nin belirteci olarak IL-28B ile ilgili elde edilmiş olan verilerin büyük bölümü bu hasta popülasyonuna aittir.

Çalışmamızda genotipleme çalışmalarında standart prosedür olan DNA sekanslaması yerine daha ucuz, daha kolay ve daha hızlı çalışılabilen bir yöntem olan PCR sonrası yüksek rezolüsyonlu erime analizi (post PCR high resolution melting - HRM – analysis) yöntemini kullandık. Elde edilen verilerin grafiğe dönüştürülmesinden sonra grafik üzerinde erime ısılarına göre C/C, C/T ve T/T genotiplerine ait oldukları gözlenen dağılım eğrilerini belirleyerek genotiplemeyi tamamladık.

Bu konuda yayınlanmış ilk makale olan, Ge ve arkadaşlarının çalışmasında rs12979860 polimorfizminin C/C genotipine sahip olan hastaların KVY oranlarının, T/T genotipine sahip olanlarına göre iki kat fazla bulunması (31) ve bu verilerin daha sonra başka etnik gruplar ve popülasyonlarda da teyid edilmesi (27) ile kronik HCV enfeksiyonu tedavisinde yeni bir çıkır açıldı.

Üstelik C/C genotipi KVY için HCV-RNA düzeyi, fibrozis evresi ve etnisiteden bağımsız olarak en güçlü belirteç olarak saptanmıştır (27,31).

Daha sonra Avrupa ve Amerika'da yapılan çalışmalarda KVY oranları ile C/C genotipi arasındaki ilişki, T/T allelini taşıyanlarla karşılaştırıldığında çok daha güçlü olarak saptandı. Öyle ki T allelinin varlığı tedavi başarısızlığının bir göstergesi olarak görülmeye başlandı (45,46).

Biz bu çalışmada genotip-1 kronik HCV enfeksiyonuna sahip 22 hastayı değerlendirdik. Hastaların hepsi pegIFN / RBV tedavisi almış ya da almakta olan olgulardı. Bu olguların 5'i daha önce tedavi görmüş ancak nüks etmiş olgulardı. Çalışma süresince 8 hasta tedavilerini tamamladı ve 7'sinde KVY, birinde de TVY elde edildi. Bu hastaların takipleri sürdürülmektedir.

Bir hasta 16. haftada yanıtız olduğu için tedavisi kesildi. Bir hastada EVY alınmasına rağmen, yan etkiler nedeni ile tedavi kesilmek zorunda kalındı. Kalan 7 hasta ise halen tedavileri süren hastalardır ve hepsinde EVY elde edilmiştir.

IL-28B polimorfizmi incelendiğinde, bu hastalar arasındaki yanıtız hasta ile daha önce tedavi verilmiş ancak KVY elde edilemeden nüks gözlenerek yeniden tedavi başlanan 5 hastada T/T genotipi görülme sıklığı (4/6 hasta %66,7), KVY elde edilen ya da tedavide iken EVY gözlenen 16 hastaya göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek idi (0/16 hasta, %0) ($p < 0,05$).

Bu bulgular, daha önceki yayınlarda gözlenen sonuçlarla paralel ve onları destekler niteliktedir. Hasta sayımızın az olması nedeni ile çalışmamızda C/C ve C/T genotipine sahip olan hastaların KVY oranlarını karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Ancak T/T genotipi ile C/C ve C/T genotipine sahip olanlar arasında nüks ve yanıtızlık beklentisi açısından anlamlı farklılık olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda test ettiğimiz polimorfizm (rs12979860) ile ilgili yapılmış çalışmalarda dikkat çeken bir unsur da bu polimorfizmin başlıca etkilerinden birisinin, erken viral yanıt oranını anlamlı bir şekilde yükseltiyor olmasıdır (23).

Çalışmamızda, tedavileri sürmekte olan 7 hasta ile, yan etkiler nedeni ile tedavisi kesilmek zorunda kalınan bir hastanın tamamında EVY elde edilmiştir ve bu hastaların birisinde C/C, diğerlerinde C/T genotipi saptanmıştır.

IL-28B geninin 3 kb üst kısmında yer alan rs1297980 polimorfizminin, pegIFN / RBV yanıtı üzerine hangi mekanizmalarla etki ettiği henüz bilinmemektedir. Bu konudaki en akla yakın açıklama bu lokalizasyona çok yakın yerleşime sahip olan IFN- λ genlerinin düzeyleri ya da aktivitelerinin etkileniyor olmasıdır. Zira tedaviye yanıt veren hastaların önemli bir ortak özelliği, başlangıçta HCV infeksiyonuna karşı daha düşük bir bazal immün yanıtı sahip olmalarıdır (47,48).

IL-28B rs12979860 polimorfizmi ile ilişkili önemli bir başka bulgu, farklı etnik gruplarda allellerin farklı dağılımıdır. Ge ve arkadaşları C allelinin en yaygın olarak Doğu Asyalılarda görüldüğünü, bunu Avrupa kökenli Amerikalıların ve Hispaniklerin izlediğini göstermişlerdir. C allelinin en az görüldüğü ırk zencilerdir (31).

Bir başka çalışmada C/C genotipinin en çok beyaz ırkta, T/T varyantının da en çok siyah ırkta görüldüğü bildirilmiştir (27). Ge ve arkadaşları siyah ırk ile beyazlar arasında KVY oranları arasında gözlenen iki kata yakın farkın C allel sıklığındaki farklılığından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (31).

Ülkemizde hangi allelin hangi sıklıkta görüldüğüne ait veriler henüz bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda incelediğimiz 22 hastada C/C genotipi 1 hastada (%4,5), C/T genotipi 17 hastada (%77,3) ve T/T genotipi de 4 hastada (%18,2) gözlenmiştir.

Hiç şüphesiz hasta sayılarının arttığı daha geniş çalışmalarda elde edilecek verilerle daha sağlıklı bir değer elde edilebilecektir. Ancak ülkemizde en sık gözlenen HCV genotipinin, genotip-1 olması ve tedavi başarısının da çok yüksek olmadığı dikkate alındığında (16,23) ülkemizde acaba C/C genotipi sıklığı az mı sorusunu akla getirmektedir.

Öte yandan C/T genotipinin de EVY ve KVY açısından T/T allelinden daha iyimser tedavi sonuçlarla birlikte olduğu değerlendirildiğinde ülkemizdeki IL-28B polimorfizmi sıklığının daha önceki yayınlarda bildirilen beyaz ırka ait sıklıkla benzer olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda IL-28B polimorfizmi ile EVY ve KVY olan hastaların durumu irdelenmesine rağmen, hastaların büyük bölümünde hızlı viral yanıt incelemesi yapılmamış olduğundan, rs12979860 polimorfizmi ile HVY

ilişkinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi mümkün olmamıştır.

Yapılan çalışmalarda, HVY olan hastalarda KVV belirleyicisi olarak ortaya çıkan unsur, rs12979860 genotipi değil, bazal viral yüküdür ve bu ilginç bir gözlem olarak öne çıkmaktadır (33). Zira HVY olmayan hastalarda KVV için en güçlü prediktör C/C genotipinin varlığı olmuştur.

Bunun nedeni HVY'ı olan hastalarda C/C sıklığının HVY'ı olmayanlara göre anlamlı şekilde daha yüksek olması ve bu nedenle KVV için belirleyici olma gücünü kaybediyor olmasıdır. Oysa HVY'ı olmayan hastalarda C/C genotip sıklığı daha düşüktür ve C/C genotipi olanlarda KVV oranı daha yüksek görülmektedir (33).

Gerek daha önceki çalışmalarda, gerekse bizim çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, IL-28B genotiplemesinin HCV genotip-1 ile infekte hastalarda KVV için ileri derecede belirleyici olduğunu göstermesine rağmen, bu polimorfizmin bireysel düzeydeki prediktif değerinin mutlak olmadığı ifade edilmektedir. Bu nedenle IL-28B genotiplemesi tedavi stratejisini belirlemede yegâne unsur olarak kabul edilmemelidir (49).

Ayrıca bu polimorfizmlerin varlığı ve genotiplemelerine göre tedavi süreleri ile ilgili kısaltma kararları verilebilirse de, bu konuda bir önermede bulunmaya yetecek kadar veri elde bulunmamaktadır (49).

Ancak herşeye rağmen IL-28B polimorfizmlerinin prediktif değerleri vardır. Bu nedenle KVV'nin öngörülebilmesi için, tedavi başlanacak her hastaya tedaviden önce IL-28B polimorfizmi incelemesi ve genotiplemesi yapılmasının önerilmesi makul bir yaklaşımdır.

Öte yandan bu öngörü kabiliyetine rağmen, rs12979860 polimorfizminin etki mekanizmasının bilinmiyor olması önemli bir soru işareti olarak durmaktadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada IL-28B'nin HCV replikasyonunu JAK-STAT yolu üzerinden, hem doz hem de zamana bağlı olarak inhibe edebildiği gösterilmiştir (50).

Dolayısı ile IL-28B genotipinin, kronik HCV hastalarında intrahepatik interferonun stimüle ettiği genlerin farklı ekspresyonlarına neden olduğu ve IL-28B genlerine ait iyi allelere sahip (C/C, C/T) bireylerde IL-28 B/A genlerinin düzeylerinin belirgin şekilde daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur (51,52).

Tüm bu kanıtlar IL-28B'nin bu polimorfizmler aracılığı ile hem doğrudan antiviral etki hem de immün aracılı mekanizmalarla etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak etki mekanizmasını daha açık bir şekilde ortaya koyabilecek çalışmalara halen ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızın iki zayıf noktasından birisi, hastaların bir bölümünün retrospektif olarak incelenmiş olması; diğeri de farklı genotipik allelere sahip hasta sayılarının az olması idi. Ancak bu kısıtlamaların her ikisi de bu konuda yapılmış çalışmalarda öne çıkan sınırlayıcı unsurlar olarak ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda öne çıkan bulgular özetlenecek olursa:

Genotip-1 kronik HCV nedeni ile tedavi alan 22 hastanın IL-28B polimorfizmi için yapılan genotipleme çalışmasında 1 hastada C/C, 17 hastada C/T ve 4 hastada T/T genotipi saptadık. Bu hastalar EVY ve KVV durumlarına ve nüks ve tedaviye yanıtızlık durumlarına göre değerlendirildiklerinde nüks ve tedaviye yanıtız olgularda T/T genotipi EVY, TVY ve KVV gözlenen olgulara göre belirgin şekilde daha yüksek sıklığa sahipti (% 66,7 ye karşı %0) ($p<0,05$).

Prospektif olarak çalışmaya dahil edilen 8 hastanın 1'inde C/C genotipi, diğelerinde C/T genotipi mevcut idi ve bu hastaların hepsinde EVY elde edildi. Bu hastaların yan etki nedeni ile tedavi kesilmek zorunda kalınan biri dışında hepsi tedavilerini sürdürmektedirler.

Daha önceden tedaviye başlanmış olan ve KVV elde edilmiş olan hastaların tamamında C/T genotipi mevcut idi.

Sonuç olarak çalışmamızda, IL28-B polimorfizmini (rs12979860) C/C ve C/T genotipi ile taşıyanlarda EVY, TVY ve KVV görülme sıklığının T/T genotipi taşıyan hastalara göre anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu; hastalığın nüks ettiği ya da yanıtız olduğu hastalarda da T/T genotipi sıklığının anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Bu gözlemlerimizin ışığında IL-28B polimorfizminin genotip-1 kronik hepatit C hastalarında tedavi cevabının öngörülmesinde önemli bir unsur olduğu; dolayısı ile tedavi düşünölen hastalarda KVV'ın tahmin edilebilmesi ve tedavi süresi konusunda planlama yapılabilmesi maksatları ile tedaviden önce IL-28B polimorfizmi genotipleme çalışmalarının yapılmasının yararlı olacağı

kanaatindeyiz.

Bu tetkikin rutin uygulamaya geçebilmesi açısından, yöntemin kolaylığı ve ucuzluğunu dikkate alarak bu çalışmada kullandığımız PCR sonrası yüksek rezolüsyonlu erime analizi (*post PCR high resolution melting - HRM – analysis*) yönteminin, genotipleme çalışmalarında standart prosedür olan DNA sekanslaması yerine kullanılarak sekanslamanın gerek duyduğu sofistike ekipman ve yüksek maliyeti ortadan kaldırabilmenin mümkün olabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızın sonuçları, benzer diğer çalışmalar gibi, IL-28B polimorfizmine ait rs12979860 tek nükleotid polimorfizminin ve diğer polimorfizmlerin belirlenmesinin, yalnızca pegIFN / RBV tedavisi için değil aynı zamanda gelecek yeni tedavi yaklaşımlarında da KVV öngörülmesi maksadı ile kullanılacak prediktörler olarak değer kazanmaya devam edeceklerini düşündürmektedir.

6. ÖZET

Kronik hepatit C virüs infeksiyonunun seyrinde genetik faktörlerin, doğal seyir ve tedavi yanıtı üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar yakın zamanda interlökin 28B genine yakın alanda saptanan bir polimorfizmin (rs12979860) özellikle genotip-1 ile infekte bireylerde, tedavi cevabı üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Ülkemizde kronik hepatit C olgularının büyük bölümü genotip-1 ile infektidir ve bu grup hastalarda tedavi yanıtı diğer genotiplere göre daha kötüdür.

Bu çalışmada, tamamı genotip-1 olan kronik HCV hastalarında IL-28B polimorfizmi varlığı, genotipleme ve farklı klinik seyirlere sahip hastaların bu farklılıklarının IL-28B polimorfizmi ile ilişkisini araştırdık.

Çalışmaya kronik HCV tanısı almış, tedaviyi tamamlamış ve tam veya kalıcı viral yanıtı olan ya da cevapsızlık nedeni ile tedavisi yarım kalan hastalar alındı. Hastalar standart tedavi için gerekli olan ölçütler dikkate alınarak, cinsiyete bakılmaksızın seçildiler. Bilinen malign hastalığı olanlar araştırma kapsamı dışında bırakıldı.

Hastalara ait plazma örneklerinden genomik DNA'lar ekstrakte edildi. Genotipleme, ekstrakte edilen DNA örnekleri, primerler ve HRM (high resolution melting) genotipleme kiti kullanılarak yapıldı.

Çalışmaya 15 kadın, 7 erkek toplam 22 hasta alındı. Olguların yaşları 30 ile 80 yıl arasında değişmekteydi (*ortalama 53,6 ± 11,4 yıl*) ve kadın ve erkekler arasında yaş dağılımı açısından istatistiksel farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

Hastaların genotipleme çalışmasında 1 hastada C/C, 17 hastada C/T ve 4 hastada T/T genotipi saptadık. Çalışmaya alınan ve prospektif olarak takip edilen 8 hastanın 1'inde C/C genotipi, diğerlerinde C/T genotipi mevcut idi ve bu hastaların hepsinde erken viral yanıt (EVY) elde edildi. Daha önceden tedaviye başlanan ve kalıcı viral yanıt (KVY) elde edilen hastaların tamamında C/T genotipi mevcut idi. Daha önceden tedavi alıp nüks eden 5 hastanın 3'ünde ve tedaviye yanıtı olmayan 1 hastada T/T genotipi gözlemlendi.

Sonuç olarak çalışmamızda, IL28-B polimorfizmini (rs12979860) C/C ve C/T genotipi ile taşıyan hastalarda EVY, tedavi sonu viral yanıt (TVY) ve KVY görülme sıklığının T/T genotipi taşıyan hastalara göre anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu; hastalığın nüks ettiği ya da yanıtı olmayan hastalarda da T/T genotipi sıklığının anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmamızın sonuçları, IL-28B'ye ait rs12979860 tek nükleotid polimorfizminin belirlenmesinin, pegIFN / RBV tedavisi alan hastalarda KVY'ın öngörülmesi amacıyla kullanılabileceğini ve genotip-1 hastalarda tedavi öncesi belirlenmesinin yararlı olacağını düşündürmektedir.

7. SUMMARY

Studies on the effects of genetic factors influencing the course of chronic hepatitis C virus infection and the treatment response have recently revealed that a polymorphism (rs12979860), defined at close proximity to interleukin 28B gene has a role on the treatment response, especially in patients with genotype-1 infection.

Majority of chronic hepatitis C patients in our country is infected with genotype-1 virus and treatment response in this group of patients is poorer than that of other genotypes.

In this study, genotype-1 chronic hepatitis C patients, who had different clinical courses, for IL-28B polymorphism and genotyping were evaluated for the relationship of these differences with IL-28B polymorphism.

Patients with chronic hepatitis C, who completed a treatment course and who achieved end-treatment (ETVR) or sustained (SVR) viral response; or those who stopped treatment because of null response were included in the study. Patients were selected according to the criteria for initiating standard treatment, whether they are male or female. Those with known malignancies were excluded from the study.

Genomic DNAs were extracted from plasma samples of patients. Genotyping was performed using extracted DNA samples, primers and HRM (high resolution melting) genotyping kit.

Twenty-two patients (15 women and 7 men) were included in the study. Age range was between 30 and 80 (*mean 53.6 ± 11.4 years*) and there was no statistically significant difference between the ages of men and women ($p>0.05$).

Genotyping study revealed that one patient has C/C genotype, 17 patients had C/T genotype and 4 patients had T/T genotype. Of the 8 patients prospectively included in the study (who are still under treatment), 1 had C/C and the others had C/T genotype and all these patients achieved early viral response (EVR) during their treatment. Of the patients who had been on treatment previously and who achieved SVR, all had C/T genotype. Finally 1 patient who was unresponsive to treatment and of 3 of 5 patients who previously received treatment and then relapsed had T/T genotyping.

In conclusion, we observed in this study that, in patients who have IL-28B polymorphism in the form of C/C and C/T genotyping EVR, TVR and SVR rates are significantly higher than those with T/T genotyping; and that T/T genotyping is significantly more frequent in patients who relapsed or who were unresponsive to treatment.

Results of our study suggest that determination of single nucleotide polymorphism for IL-28B could be used for predicting SVR in patients who are given pegIFN / RBV treatment and that in patients with genotype-1 infection it is useful to determine this polymorphism prior to treatment.

KAYNAKLAR

1. Balagopal A, Thomas DL, Thio CL. IL28B and the Control of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology*. 2010;139(6):1865-76.
2. Halfon P, Bourliere M, Ouzan D, Maor Y et al. A single IL28B genotype SNP rs12979860 determination predicts treatment response in patients with chronic hepatitis C Genotype 1 virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23(10):931-5.
3. Thomas DL, Thio CL, Martin MP et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009;461(7265):798-801.
4. Simmonds P. Reconstructing the origins of human hepatitis viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 29; 356 (1411):1013-26.
5. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13(17):2436-41
6. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int*. 2009;29 (Suppl 1) : 74-81.
7. Tabak F, Balık İ. Viral hepatit 2009. *Viral hepatitle savaşım derneği*. 2009
8. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2011;55(2):245-64.
9. Bowden DS, Berzsenyi MD. Chronic Hepatitis C Virus Infection: genotyping and it's Clinical Role. *Future Microbiol*. 2006;1(1):103-12.
10. Nakano I, Fukuda Y, Katano Y et al. Interferon responsiveness in patients infected with hepatitis C virus 1b differs depending on viral subtype. *Gut* 2001;49(2):263-7.
11. Pradat P, Trépo C. HCV: epidemiology modes of transmission and prevention of spread. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2000;14:201-10.

12. Cecil Medicine 23. Baskı 2011; 152:S1113
13. Tabak F, Akarca U, Balık İ, Örmeci N. III. Viral hepatit tanı ve tedavi rehberi. *Viral hepatitle savaşım derneği. 10 Aralık 2011-Ankara.*
14. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology. 2004;39(4):1147-71*
15. Dienstag JL. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. *Hepatology. 2002;36(5 Suppl 1):S152-60.*
16. Leblebicioęlu H., Kronik Hepatit C' de güncel tedavi ; *ANKEM Derg 2006; 20(Ek2): 208-212*
17. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C et al. Randomised trial of interferon alfa 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alfa 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet. 1998; 352(9138): 1426-32.*
18. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med. 1998; 339(21): 1485-92.*
19. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet. 2001;358(9286):958-65.*
20. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med 2002; 347:975-82.*
21. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M et al. Peginterferon alfa-2a (40 kilodaltons) and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med. 2004;140(5):346-55.*

22. Shepherd J, Brodin H, Cave C, Waugh N, Price A, Gabbay J. Pegylated interferon alpha-2a and -2b in combination with ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2004 Oct;8(39):iii-iv, 1-125.
23. Çakaloğlu Y, Direkt etkili antiviral ajanlarla sağlananlar-Kronik Hepatit C tedavisi '2012: *ANKEM Derg* 2012;26(Ek 2):135-143
24. O'Leary JG, Davis GL. Hepatitis C. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, editors. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease - Pathophysiology, Diagnosis, Management. 9th Edition. *Philadelphia: Saunders – Elsevier Company; 2010. p. 1313-1336*
25. Abacıoğlu H., HCV İnfeksiyonlarının Tedavi Başarısında Viral Faktörlerin Önemi. *ANKEM Derg* 2012;26 (Ek 2):150-156
26. Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(1):38-45.
27. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D et al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology.* 2010;139(1):120-9.e18.
28. Witte K, Witte E, Sabat R, Wolk K. IL-28A, IL-28B, and IL-29: Promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(4):237-51
29. Thomas E. Genome-Wide Association Studies: "SNPing" Away at Liver Disease. *Gastroenterol Hepatol.* 2011;7(6):407-9.
30. Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106(1):38-45.
31. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature.* 2009;461:399-401.

32. Yu ML, Dai CY, Huang JF, Chiu CF, Yang YH, Hou NJ, Lee LP et al. Rapid Virological Response and Treatment Duration for Chronic Hepatitis C Genotype 1 Patients: A Randomized Trial. *Hepatology*. 2008;47(6):1884-93.
33. Lin CY, Chen JY, Lin TN, Jeng WJ et al. IL28B SNP rs12979860 Is a Critical Predictor for On-Treatment and Sustained Virologic Response in Patients with Hepatitis C Virus Genotype-1 Infection. *PLoS One*. 2011;6(3):e18322.
34. Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V et al. IL28B polymorphism determines treatment response of patients with hepatitis C genotypes 2 or 3 who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology*. 2010;139(3):821-7, 827
35. Sarrazin C, Susser S, Doehring A, Lange CM et al. Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. *J Hepatol*. 2011;54(3):415-21.
36. Cooper CL, Druyts E, Thorlund K, Nachega JB, El Khoury AC, O'Regan C, Mills EJ. Boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C genotype 1 infection: an indirect comparison meta-analysis. *Ther Clin Risk Manag*. 2012;8:105-30.
37. Kwo PY. Phase III results in Genotype 1 naïve patients: predictors of response with boceprevir and telaprevir combined with pegylated interferon and ribavirin. *Liver Int*. 2012;32 Suppl 1:39-43.
38. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H et al. Amino Acid Substitution in Hepatitis C Virus Core Region and Genetic Variation Near the Interleukin 28B Gene Predict Viral Response to Telaprevir with Peginterferon and Ribavirin. *Hepatology*. 2010;52(2):421-9.
39. Fabris C, Falletti E, Cussigh A, Bitetto D et al. IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: Role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. *J Hepatol*. 2011;54(4):716-22.
40. Kovanda A, Poljak M. Real-time polymerase chain reaction assay based on high-resolution melting analysis for the determination of the rs12979860 polymorphism involved in hepatitis C treatment response. *J Virol Methods*. 2011; 175(1): 125-8.

41. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clin Chem.* 2003;49(6 Pt 1):853-60.
42. McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, et al. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2009;360:1827-1838.
43. Hezode C, Forestier N, Dusheiko G, et al. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med.* 2009;360:1839-1850.
44. Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, et al. Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment naive patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet.* 2010;376:705-716.
45. Stättermayer AF, Stauber R, Hofer H, et al. Impact of IL28B genotype on the early and sustained virologic response in treatment-naive patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9:344-350.
46. McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, et al. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology.* 2010;138:2307-2314.
47. Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, Coltescu C, et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology.* 2005;128(5):1437-44.
48. Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, Filipowicz W, et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(19):7034-9.
49. Afdhal NH, McHutchison JG, Zeuzem S, Mangia A, Pawlotsky JM, et al. Hepatitis C pharmacogenetics: State of the art in 2010. *Hepatology* 53: 336–345.
50. Zhang L, Jilg N, Shao RX, Lin W, Fusco DN, et al. IL28B inhibits Hepatitis C virus replication through the JAK-STAT pathway. *J Hepatol.* 2011;55(2):289-98.

51. Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, Fellay J, Schuppan D, et al. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2010; 52: 1888–1896.

52. Langhans B, Kupfer B, Braunschweiger I, Arndt S, Schulte W, et al. Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 2011; 54(5): 859-65.