

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**HEPATİT C'Lİ HASTALARDA RİBAVİRİNE BAĞLI ANEMİDE
S-ADENOZİL HOMOSİSTEİN HİDROLAZ GENETİK
VARYASYONLARININ VE METİLENTETRAHİDROFOLAT
REDÜKTAZ GEN POLİMORFİZMLERİNİN ETKİSİ**

Dr. Zühal MERT ALTINTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL

MERSİN-2006

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**HEPATİT C'Lİ HASTALARDA RİBAVİRİNE BAĞLI ANEMİDE
S-ADENOZİL HOMOSİSTEİN HİDROLAZ GENETİK
VARYASYONLARININ VE METİLENTETRAHİDROFOLAT
REDÜKTAZ GEN POLİMORFİZMLERİNİN ETKİSİ**

Dr. Zühal MERT ALTINTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından SBE TTB
ZA 2005 03 YL numaralı proje olarak desteklenmiştir.


Tez No:

MERSİN-2006

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Hepatit C’li Hastalarda Ribavirine Bağlı Anemide S-Adenozil Homosistein Hidrolaz Genetik Varyasyonlarının ve Metilentetrahidrofolat Redüktaz Gen Polimorfizmlerinin Etkisi” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 10/07/2006



Prof. Dr. M. Emin ERDAL
Mersin Üniversitesi
Jüri Başkanı

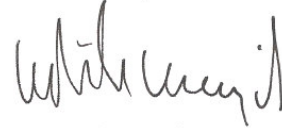


Yrd. Doç. Dr. Ömer BARLAS
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Orhan SEZGİN
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 12.07.2006 tarih ve 2006/160 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Murat DİKMENGİL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, Anabilim Dalı Başkanımız, danışman hocam Sn. Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği titizlik, özveri ve bilimsel katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Sn. Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŐ'e, Sn. Yrd. Doç. Dr. Etem AKBAŐ'a ve Yrd. Doç. Dr. İ. Ömer BARLAS'a yüksek lisans eğitimin boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Tezimde yer alan hasta gruplarının toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı, ME.Ü. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı Öğretim Üyeleri Sn. Prof. Dr. Orhan SEZGİN, Sn. Doç. Dr. Engin ALTINTAŞ ve Sn. Arő. Gör. Erdiñ NAYIR ve endoskopi hemőirelerine, tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Handan ÇAMDEVİREN ANKARALI'ya ve yüksek lisans eğitimin boyunca, her türlü desteğini esirgemeyen laboratuvarında birlikte çalıştığım arkadaşlarımdan hepsine teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi destekleriyle, eğitimin akademik yönde devam etmesini sağlayan aileme, eşime ve kızlarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hepatit C	4
2.1.1. Virus	4
2.1.2. Bulaş Yolu	4
2.1.3. Epidemiyoloji	5
2.1.4. Klinik ve Doğal Seyir	6
2.1.5. Tanı	7
2.1.6. Tedavi	8
2.1.7. Ribavirinin Metabolizması, Farmakokinetiği ve Hepatit C Virüsüne Karşı Antiviral Etki Mekanizması	9
2.1.7.1. RNA Replikasyonunun Direkt İnhibisyonu	11
2.1.7.2. IMPDH'nin İnhibisyonu	11
2.1.7.3. İmmunomodülasyon	11
2.1.7.4. Mutasyon	12
2.1.7.5. Farmakokinetik	14
2.1.7.6. Antiviral Aktivite	16
2.1.7.7. Kronik Hepatit C'de Tıbbi Tedavinin Hematolojik Yan Etkileri	18
2.1.7.8. Dozun Azaltılmasının SVY'a Etkisi	20
2.2. Metilen Tetrahidrofolatreduktaz Enzimi ve Genetik Özellikleri	21
2.3. S-Adenozil Homosistein Hidrolaz Enzimi ve Genetik Özellikleri	27

2.3.1. AdoHcy Hidrolaz	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	31
3.1. Hastaların Toplanması	31
3.2 Kullanılan Araç ve Gereçler	32
3.2.1. Aletler ve Cihazlar	32
3.2.2 Kimyasal Maddeler	32
3.2.3. Çözeltiler	34
3.3. DNA İzolasyonu	36
3.3.1 DNA İzolasyonunun Yapılışı	36
3.4. Moleküler Analiz	37
3.4.1 MTHFR Gen Polimorfizmleri	37
3.4.1.1. MTHFR C677 T Polimorfizmlerinin Belirlenmesi	37
3.4.1.2. MTHFR A1298C Polimorfizmlerinin Belirlenmesi	39
3.4.2 AHCY Gen Dönüşümleri	40
3.4.2.1. AHCY- 1 5'UTR -34 C→T Dönüşümünün Belirlenmesi	40
3.4.2.2. AHCY -2 Ekson 2 Arg38Trp 112 C→T Dönüşümünün Belirlenmesi	42
3.4.2.3. AHCY-4 Ekson 4 Try143Cys A→G Dönüşümünün Belirlenmesi	43
3.5. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
4.1. MTHFR C677T Gen Polimorfizmi Genotipleri ve Alelleri Dağılımı	48
4.2. MTHFR A1298C Gen Polimorfizmi Genotipleri ve Alelleri Dağılımı	51
4.3. AHCY-1 5'UTR -34 C→T Genotipleri ve Alelleri Dağılımı	54
4.4. AHCY-2 Ekson 2 Arg38Trp 112 C→T Genotipleri ve Alelleri Dağılımı	55
4.5. AHCY-4 Ekson 4 Try143Cys A→G Genotipleri ve Alelleri Dağılımı	57
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	67
8. ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HCV'ye karşı ribavirinin antiviral aktivitesi için önerilen mekanizmalar	13
Şekil 2.2. Homosistein'in transsülfürasyon ve remetilasyon metabolize yolları	22
Şekil 2.3. MTHFR Geni ve Çalışılan Polimorfizm Bölgeleri	26
Şekil 2.4. AHCY Geni ve Çalışılan Varyasyon Bölgeleri	30
Şekil 4.1. MTHFR 677 C/T genotiplerinin RFLP sonucu elektroforez görüntüsü	49
Şekil 4.2. MTHFR 677 C/T genotiplerinin dağılımı	49
Şekil 4.3. MTHFR 677 C/T genotiplerinin cinsiyetlere göre dağılımı	50
Şekil 4.4. MTHFR 677 C/T genotiplerinin gruplara göre dağılımı	50
Şekil 4.5. MTHFR 1298 A/C genotiplerinin RFLP sonucu elektroforez görüntüsü	52
Şekil 4.6. MTHFR 1298 A/C genotiplerinin dağılımı	52
Şekil 4.7. MTHFR 1298 A/C genotiplerinin cinsiyetlere göre dağılımı	53
Şekil 4.8. MTHFR 1298 A/C genotiplerinin gruplara göre dağılımı	53
Şekil 4.9. AHCY-1 genotiplerinin RFLP sonucu elektroforez görüntüsü	55
Şekil 4.10. AHCY-2 genotiplerinin RFLP sonucu elektroforez görüntüsü	56
Şekil 4.11. AHCY-4 genotiplerinin RFLP sonucu elektroforez görüntüsü	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Hastaların özellikleri

47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
ADA	Adenozin deaminaz
AdoHcy	S-adenozilhomosistein
AdoMet	Adenozin metiyonin
AHCY	S Adenozilhomosistein hidrolaz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
AUC	Area under curve
bp	Baz çifti
C	Sitozin
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
C_{max}	Ortalama maksimum plazma konsantrasyonu
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
e_s	Ekülibriyum duyarlı
EtBr	Etidyum bromid
EVY	Erken virolojik yanıt
FAD	Flavin adenindinükleotid
FDA	Food and Drug Administration
G	Guanin
GGT	Gamma glutamiltranspeptidaz
GTP	Guanozin trifosfat
Hb	Hemoglobin
HCV	Hepatit C virusu
Hcy	Homosistein
HVR	Hipervariable region

İFN	İnterferon
IMPDH	İnosin-monofosfat-dehidrogenaz
ITP	İmmün trombositopeni
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilodalton
LDH	Laktat dehidrogenaz
Mg⁺⁺	Magnezyum iyonu
MgCl₂	Magnezyum klorür
µl	Mikrolitre
mRNA	Mesajcı RNA
MTHFR	Metilen tetrahidrofolat redüktaz
Na₂ EDTA	Sodyum-2-etilendiamintetraasetik asit
NaCl	Sodyum klorür
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PCR	Polimeraz zincir tepkimesi
PEG-IFN	Peglenmiş interferon
RDP	Ribavirin difosfat
RdRp	RNA bağımlı RNA polimeraz
RE	Restriksiyon endonükleaz
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RMP	Ribavirin monofosfat
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
RTP	Ribavirin trifosfat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SVY	Sürdürülebilir virolojik yanıt
T	Timin
TBE	Tris-borat- etilendiamintetraasetik asit
TE	Tris-etilendiamintetraasetik asit
Th	T Yardımcı Hücreleri

THF	Tetrahidrofolat
t_{max}	Maksimum konsantrasyona kadar geçen süre
Tris-HCl	Tris-hidroklorid
TSY	Tedavi sonu yanıt
UTR	Untranslated region

ÖZET

Günümüzde kronik hepatit C infeksiyonu tedavisinde interferon ve ribavirin kullanılmaktadır. Ancak bu hastaların %10'unda ilaç kesmeyi gerektirecek kadar şiddetli anemi gelişmektedir. Ribavirinin eritrositlerde S-adenozilhomosistein hidrolaz (AHCY) aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur. Bu çalışmanın amacı AHCY gen varyasyonlarının ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen polimorfizmlerin ribavirin anemisindeki etkisini araştırmaktır.

Kronik C hepatiti tanısı nedeniyle interferon ve ribavirin tedavisi almış olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Veriler; başlangıç hemoglobin, platelet sayısı, AST, ALT, GGT ve LDH değerleri ile vücut kitle indeksi hastane kayıtlarından temin edildi. Hemoglobin seviyelerinde ≥ 2 gramlık düşmeye göre iki gruba ayrıldı. MTHFR için C677T ve A1298C polimorfizmleri ve AHCY1 5'UTR -34 C→T, AHCY2 112 C→T, AHCY4 143 A→G varyasyonlarına bakıldı.

Anemi sıklığı 52/85 (% 61.17) olarak bulunmuştur. Gruplar arasında risk faktörlerine bakıldığında sadece yaş açısından belirgin bir ilişki olduğu belirlendi. Yaş arttıkça anemi riski 1.112 (OR) kat artmaktaydı ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0.009). Gruplar arasında bakılan gen polimorfizmleri ve genetik varyasyonlar yönünden bir ilişki bulunamadı. MTHFR C677T gen polimorfizmine ait T/T genotipinin anemi olanlarda C/C genotipine göre 6.029 kat daha fazla görüldüğü belirlendi ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0.137). MTHFR A1298C gen polimorfizmine ait C/C genotipinin anemi olanlarda A/A genotiplilere göre 3.586 kat fazla olmakla birlikte bu fazlalık istatistiksel olarak bulunmadı (p=0.124).

MTHFR C677T için T/T genotipine ve A1298C için C/C genotipine anemi olanlarda daha sık rastlanmasına rağmen. MTHFR gen polimorfizmleri ve AHCY genetik varyasyonları ribavirinle ilişkili anemi için bir risk faktörü değildir. Yaşla birlikte ribavirinle ilişkili anemi riski arttığı için bu gruba tedavi verilirken daha dikkatli olunmalıdır.

Anahtar kelimeler; interferon, ribavirin, anemi, metilentetrahidrofolat redüktaz, S-adenozilhomosistein hidrolaz, gen polimorfizmi.

ABSTRACT

Today interferon and ribavirin are used for treatment of chronic hepatitis C infection. Nevertheless 10 percent of these patients undergo such a drastic anemia that causes even withdrawal medication. It is proved that ribavirin inhibits the activation of S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) in erythrocytes. The aim of this study is to investigate the effect of AHCY gene variations and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms on ribavirin anemia.

The patients treated with interferon and ribavirin for chronic hepatitis C is included in the study. Data such as preliminary hemoglobin, platelet count, AST, ALT, GGT and LDH values and body-mass index is gathered from the patient records. They are grouped into two according to decline in hemoglobin level ≥ 2 grams. For MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and variations of AHCY1 5'UTR -34 C→T, AHCY2 112 C→T, AHCY4 143 A→G are studied.

Frequency of anemia is found as 52/85 (61.17%). Considering the risk factors among the groups it is determined that there is a significant relation on age only. The risk of anemia was found to be increased by 1.112, which was statistically logical ($p=0.009$). No relation was found among groups regarding gene polymorphisms and genetic variations. Compared to C/C genotype, T/T genotype of MTHFR C677T is found to be more common by 6.029 in anemic patients, but this result is not found to be statistically significance ($p=0.137$). In anemic patients the C/C genotype of MTHFR A1298C gene polymorphism is recorded 3.586 times more than ones with A/A genotype, however this result is not found statistically significance ($p=0.124$).

Although T/T genotype for MTHFR C677T and C/C genotype for A1298C has been observed more frequently in anemic patients, MTHFR gene polymorphisms and AHCY genetic variations are not considered as risk factors for ribavirin related anemia. Since ribavirin related anemia is increasing with age, great care should be taken when treating this group.

Key words; interferon, ribavirin, anemia, methylenetetrahydrofolate reductase, S-adenosylhomocysteine hydrolase, gene polymorphism.

GİRİŞ

Ribavirin, bir pürin nükleosid analogudur. Etki mekanizması hala tartışılmakta birlikte, guanozin trifosfat sentezi için gereken enzim olan inozin monofosfat dehidrogenaz'ı inhibe ederek geniş sayıda DNA ve RNA virüsünün replikasyonunu önler. Olaylar zincirinin bu son basamağı, RNA genomunun ölümcül mutagenesidir (1). Günümüzde hepatit C'li hastaların tedavileri, interferon- α ve ribavirin'in birleşimi ile yapılmaktadır (2,3). Kombinasyon tedavisi, interferon tekli tedavisi ile kıyaslandığında, yan etkilerin sayısı artmıştır (2-9). Doz azaltımı sıklıkla ve esas olarak kombinasyon tedavisi verilen hastalarda %10 sıklıkta görülen anemide gerek duyulmaktadır (2-5). Ribavirin kullanımı ile ilişkili ana toksisite, hemolitik anemidir. Bu yan etki, ribavirin trifosfat'ın eritrosit içinde birikerek, eritrosit fonksiyonlarını engellemesine bağlanmıştır (10,11).

Ribavirin kullanımının komplikasyonlarından biri olan hemolitik anemi, bazen tedavinin kesilmesine yol açabilir (12). Anemi, olasılıkla ribavirinin eritrositlerde birikimine bağlıdır ve ribavirin, eritrosit içine girince aktif formuna fosforillenir ve plazmadakinden 9 kat daha fazla olacak şekilde hücrelerin içinde birikir (13). Mekanizma henüz tam olarak belirlenememekle birlikte, ribavirin fosfat'ın, eritrosit hücre membranlarında yer alan ATP ile yarışarak ATP-bağımlı taşıma sistemlerini yavaşlattığına inanılmaktadır ve sonuçta muhtemelen membran stabilizasyonu bozulmaktadır.

Ribavirin gibi bazı adenozin analoglarının, önceden, eritrosit lizatlarında, S-adenozilhomosistein hidrolaz (AHCY) aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur. Ribavirinin (inosinat dehidrogenaz inhibitörü), bilinen diğer etki mekanizmalarına ek olarak, AHCY aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi de vardır, bu durum, antiviral etkisinde önemli olabilir (14). Homosistein, metiyonin'in demetilasyonu ile oluşan bir metabolik araçtır (15). Birinci basamak, S-adenozil metiyonin (AdoMet) oluşumudur, bu daha sonra, S-adenozil homosistein'e (AdoHcy) demetile olur (15). AdoHcy, AHCY tarafından adenozin ve homosistein'e (hcy) hidrolize edilir. (15). AdoMet, birçok transmetilasyon reaksiyonunda görev alan önemli bir metil donörüdür (15). AdoMet'nin metaboliti olan AdoHcy, AdoMet bağlanma alanlarıyla yarışarak, metiltransferaz

enzimlerinin güçlü bir inhibitörü ve sitotoksik olmayan bir hipometilasyon ajanıdır (16). Eş zamanlı oluşan AdoMet seviyesinde azalma ve AdoHcy seviyesinde artma, proteinler, DNA, RNA, fosfolipidler ve diğer küçük molekülleri içeren birçok doku komponentlerinin metilasyonunu inhibe etmektedir (15). Homosisteinemi ve homosistinüri hastalarda, eritrositlerdeki bu değişiklikler karakteristik değildir (17).

AHCY, AdoHcy'yi Hcy ve adenozeine hidrolizler. Bu reaksiyonun termodinamikleri AdoHcy sentezini güçlü biçimde tetikler ancak her iki ürün hızla uzaklaştırıldığından, in vivo koşullarda AdoHcy'nin yıkımı genellikle ağırlıklıdır. AdoHcy, AdoMet'e bağımlı tüm metiltransferazlar tarafından üretilir ve metiltransferazların güçlü bir inhibitörüdür (15).

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, folat metabolizmasında önemli bir enzimdir (18,19). MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) geri dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür (19-21). 5-metil THF; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar (20-22). 5,10- metilen THF ise deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil THF'a okside olmaktadır (20,21). MTHFR geninde meydana gelen bir mutasyon (en yaygın olanı C677T polimorfizmi) enzim aktivitesini azaltmaktadır (22,23). Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5-metil THF düzeyi azalmakta, 5,10- metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır (18,20-23).

MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur (22,24-30). A1298C ve C677T mutasyonunun sıklığı popülasyonlara göre önemli farklılık göstermektedir (31). A1298C ve C677T mutasyonlarının birlikte heterozigot olduğu durumda, MTHFR enzim aktivitesi, her iki allelin normal homozigot olduğu durumdaki enzim aktivitesinin %50-60'ı kadardır (31). Bu aktivite, C677T mutasyonunun heterozigot bireylerinin enzim aktivitesinden daha düşüktür (31).

MTHFR tek karbon metabolizmasında anahtar bir enzimdir. Metilenetetrahidrofolatın MTHFR tarafından indirgenmesiyle oluşan metiltetrahidrofolat timidin ve pürin sentezine tek karbon birimlerini ve çeşitli biyolojik metilasyon reaksiyonları için metil grubu sağlar (15,17). Hcy'in metiyonin sentetaz

aracılığıyla katalizlenerek metiyonine dönüşümünde de metiltetrahidrofolat metil vericisi olarak kullanılmaktadır (15,17). MTHFR aktivitesindeki azalma Hcy düzeylerinde artışla sonuçlanır. Hücre içi Hcy, AdoHcy'den AHCY etkisiyle türemektedir (15). Bu reaksiyon, hidrolizden ziyade kuvvetli şekilde AdoHcy sentezi yönüne doğru dinamik dengeli geri dönebilir bir reaksiyondur (15). Bu nedenle, AdoHcy birikimini engellemek için Hcy'in etkin şekilde metabolik olarak uzaklaştırılması gerekir (15). Hücre içi AdoHcy birikiminin toksisitesi birçok AdoMet bağımlı metiltransferazların baskılanması nedeniyledir (15). Ribavirin etkisini aynı zamanda AHCY üzerinden göstermektedir (14). Ribavirin AHCY'ı inhibe ederek homosistein metabolizmasında demetilasyonla AdoMet'in AdoHcy'e dönüşüm basamağını durdurarak artan AdoHcy sayesinde tüm transmetilasyon işlemlerini engelleyebilir. Bu nedenle MTHFR ve AHCY'deki genetik değişiklikler ribavirin anemisinde rol oynayabilir (32-36). Bu çalışmanın amacı AHCY genetik varyasyonlarının ve MTHFR gen polimorfizmlerinin ribavirin anemisindeki etkisini araştırmaktır.

2-GENEL BİLGİLER

2.1 HEPATİT C

2.1.1 Virus

Hepatit C virusu (HCV) zarfsız, tek sarmallı bir RNA virusu olup Flavivirus olarak sınıflandırılmıştır. HCV genomu 9600 nükleotid uzunluğundadır. Genomun 5'UTR bölgesi, farklı HCV tipleri arasında %92 oranında homoloji göstermektedir. Yapısal proteinler; kor proteini, zarf proteini-1 (E1),ve zarf proteini-2 (E2)'den oluşur . Genomun çok değişken bölgeleri (hipervariable region; HVR1 ve HVR2) içeren E2' nin amino ucu, HCV izolatları arasında önemli değişiklikler gösterir. Bu değişim virusun nötralizan antikorlardan kaçmasına neden olur. Yapısal olmayan proteinler NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B'dir. Proteaz aktivitesi içeren NS2 ve NS3'ün amino ucu, yapısal olmayan proteinlerin bölünmesinden sorumludur. HCV helikaz, NS3'ün karboksi ucunda lokalize olmuştur. NS4A, NS3 proteaz için bir kofaktördür, NS4B'nin işlevi hala bilinmemektedir. HCV genotiplerini (serotiplerini) saptamak için ELISA testinde NS4 bölgesinin antijenleri kullanılır. NS5A'nın işlevi bilinmemektedir. Bazı Japon araştırmacılar tarafından interferon'a duyarlı bazı bölgeler bildirilmiştir. HCV-RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi NS5B bölgesinde yer alır ve başlıca virus replikasyonundan sorumludur. 3'UTR bölgesi 27-55 nükleotid uzunluğunda olup poly(U)'da sonlanmaktadır ve viral replikasyonda rol aldığı düşünülmektedir (37).

2.1.2 Bulaş Yolu

Dünyada yaklaşık 170 milyon insanın HCV ile infekte olduğu tahmin edilmekte ve bu nedenle önemli bir sağlık sorunu olarak halen devam etmektedir (38). HCV virusu insandan insana parenteral temas ile bulaşmaktadır (38). Kuzey Avrupa ve

ABD’de geçmişteki en önemli bulaşma kan ve kan ürünleri ve uyuşturucu kullananlarda iğne paylaşımı ile olmuştur (39). 1985’den önce transfüzyon yapılan yaklaşık her on ünite kandan birinde HCV enfeksiyon riski bulunmaktaydı ve yıllık HCV insidansı 180.000 olarak tahmin edilmekteydi (40).

Günümüzde tüm kan merkezleri bağış olarak aldıkları kanlarda anti-HCV antikorları araştırmaktadır. Bu nedenle kan transfüzyonu ile bulaşma ihtimali çok zayıftır. Kan ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan yöntemler de uygun olduğu takdirde HCV ile bulaş söz konusu olamaz (39).

Ülkemizde ise bulaşma yolunun nasıl olduğu daha az barizdir, çünkü hepatit C saptananların önemli bir kısmında yukarıda belirtilen yollarla bulaşma söz konusu değildir. Parenteral işlemler için kullanılan tıbbi malzemelerin birden fazla kişiye kullanılması bulaşma nedeni olabilir. Günümüzde iğne ve enjektör gibi sık olarak kullanılan tıbbi malzemeler, bir kişi kullandıktan sonra atıldığından bulaşma azalmıştır. Ev-içi, iş ve diğer sosyal temasların hepatit C bulaşmasına yol açmadığı kabul edilmektedir (39).

2.1.3 Epidemiyoloji

Hepatit C’nin genel toplumdaki sıklığı, Mısır’da %5’in üzerinde, Japonya’da %2-3, ABD ve Fransa’da %1-2, diğer Avrupa ülkelerinde ise %0.3-1 arasındadır (37). Ülkemizde, yapılan ve 5000 sağlıklı kişiyi kapsayan bir çalışmada sıklık %0.3 bulunmuştur (39).

Aynı taramada HBsAg pozitifliği oranı ise %8 civarındadır (39). Oysa, Mısır hariç, yukarıda söz edilen ülkelerde HBsAg pozitiflik oranı %1’in altındadır (39). Sonuçta ülkemizin hepatit C açısından şanslı bir konumda olduğu söylenebilir. Bu taramanın nisbeten genç olan bir hasta popülasyonunda yapıldığı dikkate alındığında, daha yaşlı olan popülasyonda biraz daha yüksek oranlara rastlanabileceği düşünülebilir (39).

2.1.4 Klinik ve Doğal Seyir

Hepatit C, hastalığın geç evrelerine kadar sessiz olan bir hastalıktır. Hastalığı akut hepatit devresinde yakalamak çok zordur. Çünkü genellikle asemptomatiktir, veya semptomlar özgül değildir. İkterik akut hepatiti tanımak zor değildir. Anikterik olgularda ise, halsizlik, yorgunluk ve dispepsi gibi semptomlarda akut hepatitin akla gelmesi bu yönden tetkik yapılmasıyla tanı konulabilir (39).

Akut hepatit C, çoğunlukla asemptomatik olup, nadiren sarılıkla seyreder; bu nedenle akut hepatit C tanısı nadir olarak konur. HCV enfeksiyonuna yakalanan kişilerin %70-85'inde kronik enfeksiyon gelişir ve bunların en az yarısında serum ALT'nin yükselmesi ile tanımlanan kronik hepatit gelişimi söz konusudur (41). Kronik hepatit C çoğunlukla asemptomatik olmasına rağmen, hastaların yaklaşık %15'inde enfeksiyonun seyri sırasında semptomlar ortaya çıkar ve bazende ekstrahepatik semptomlar eşlik edebilir (41).

Akut devrede anti-HCV antikorlarının saptanabilir düzeye gelmeleri 4-6 hafta almaktadır ve tanı konulabilmesi için HCV-RNA'nın araştırılması gerekmektedir. Olayın akut hepatit evresinde yakalanması tedavi açısından çok avantajlı bir noktadır. Çünkü akut hepatit devresinde tedavinin etkinliği %80'in üzerindedir (39).

Akut hepatit geçirenlerin %15-30'unda olay iyileşme ile sonuçlanmakta ve HCV-RNA spontan olarak kaybolmaktadır. Olguların %70-85'inde ise hepatit C kronikleşmektedir (39). İnfeksiyondan onbeş yıl ya da daha fazla süre sonra en az %20 oranında siroz gelişmekte ve sirozlu olguların %1-3'ünde yıllık hepatosellüler karsinoma gelişme riski bulunmaktadır (42). Kronikleşen olgularda yukarıda da belirtildiği gibi genellikle klinik hastalık sirozun geç evrelerine ve hatta hepatosellüler karsinom gelişinceye kadar sessiz kalabilmektedir. Muhtemel semptomlar arasında, halsizlik, yorgunluk, düşük egzersiz toleransı, hazımsızlık vardır. Kronik hepatit C olgularının %70-80'inde olay bu devrede kalmakta ve siroz gelişmemekte, %20-30 olguda ise hastalık siroza ilerlemektedir (39).

Siroza gitme riski, virüse 40 yaşından sonra maruz kalanlarda ve birlikte alkol alanlarda ve erkeklerde daha yüksektir. Akut hepatit C'den sonra kronik hepatitin gelişme süresi ortalama 10 yıl, siroz gelişme süresi 20 yıl, hepatosellüler karsinom

gelişme süresi ise 30 yıldır. Dolayısıyla hepatit C yavaş ilerleyen, ancak yaşamları boyunca hastaların ortalama %10'unda ciddi komplikasyonlara ve ölüme yol açabilen bir hastalıktır. Fizik muayene tamamen normal olabilir. Ancak kronik hepatit evresindekilerin yarısından fazlasında hepatomegali mevcuttur. Splenomegali, palmar eritem, spider anjiom, jinekomasti, kas erimesi, ekimozlar gibi bulgular ise genellikle siroz gelişen olgularda bulunmaktadır. İlginç olarak bu evredeki hastaların bile çoğunluğu tümüyle asemptomatiktir. Bazı hastalarda tanı liken planus, kriyoglobulinemi gibi hepatit C ile yakın ilişkisi olan hastalıkların semptomları ile konulmaktadır (39).

2.1.5 Tanı

Laboratuvar tetkiklerinde birinci sırada "serum Anti-HCV" gelmektedir. Doğruluğundan emin olunabilmesi için birkaç kez tekrar edilebilmesi gerekir. İlginç olarak kan merkezlerinde yapılan testlerde Anti- HCV (+) bulunanların %30'unda daha sonra tekrarlanan testlerde Anti-HCV (-) bulunmaktadır. Anti-HCV hem hastalığı geçirip iyileşenlerde, hem de halen aktif replikasyon devam edenlerde (+)'dir. İkinci serolojik test HCV-RNA'dır. Bu test çok çeşitli metodlarla yapılmaktadır. Tanısal olarak yapılması gereken PCR metodudur. Bu metodun da çok çeşitli uygulamaları vardır. Ticari kitlerin ve laboratuvar koşulları uygun olmadığı takdirde yanlış pozitiflik ve negatiflik oranı yüksektir. HCV-RNA negatif olduğuna karar verilen, fizik muayenesi ve diğer laboratuvar tetkiklerinde anormallik saptanmayan hastalarda hepatit C'nin geçirildiğine ve halen aktif enfeksiyonun olmadığına karar verilebilir. Ancak bu kişiler hepatit C'ye karşı immun kabul edilememektedirler. Çünkü bu antikorların bulunmasına karşın kişi tekrar aynı virusla enfekte olabilmektedir. Kronik hepatit C olan hastalar serum ALT (alanin aminotransferaz) düzeyi açısından iki grupta mütalaa edilebilirler. Bir grupta HCV-RNA pozitif olmasına karşın, serum ALT düzeyi tekrarlanan tetkiklerde normal sınırlar içerisindedir. Diğer grupta ise serum ALT düzeyi yüksektir. Ancak bu yüksek olan grupta da ALT düzeyi dalgalanma göstermektedir, ve zaman zaman bu gruptakilerde de düzey normal sınırlar içerisine inebilmektedir. Ancak daha sonraki tetkiklerde tekrar yükseldiği görülmektedir. Serum AST, GGT, alkali

fosfataz gibi tetkiklerde de yükselmeler bulunabilir. Kronik hepatit C’de serum ALT düzeyinin yüksek bulunması seyrek değildir. Siroz geliştiğinde serum bilirubin ve gama-globulin düzeylerinde yükselme, serum albumin düzeyinde düşme, protrombin zamanında uzama ve sitopeni bulunabilir. Her ne kadar serum, fizik muayenesi ve serum ALT düzeyi normal olan bir hepatit C hastasının karaciğer biyopsisinde genel olarak hafif hasar saptanmaktaysa da, siroz bile bulunabilmesi hepatit C’de mümkündür (39). Tüm karaciğer fonksiyonları normal olmasına rağmen fizik muayenesinde anormallikler saptanan hastalar da karaciğer fonksiyon testleri anormal çıkanlar gibi tetkik edilmelidirler (39).

Anti-HCV (+) saptanan hastaların bir kısmında anti liver-kidney mikrozomal antikorları pozitif bulunabilmektedir (39). Bunlarda genellikle HCV-RNA negatiftir. Bu hastalarda İFN tedavisi ile alevlenme olmakta ve immünsüpresif tedavi ile sonuç alınabilmektedir (39). Karaciğer biyopsisinin en önemli amacı fibroz derecesinin değerlendirilmesidir. Fibroz derecesi 0-4 arasında değişmektedir. Fibroz’un 0 olması halinde standard koşullarda tedavi gereksizdir (39). Ancak bazı özel koşullar tedavi endikasyonu olabilir; histolojik aktivitenin ve serum ALT düzeyinin çok yüksek olması gibi. Fibrozun 1- 2 olması, tedavi için en uygun devredir. Fibroz 3 devresine geldiğinde tedavide başarı şansı düşmekte, 4 yani siroz evresine gelindiğinde ise tedaviden başarılı sonuç elde etme ihtimali çok azalmaktadır (39). Anti-HCV ve HCV-RNA (+) olan hastaların ALT düzeylerinin normal olması halinde tedavide başarı şansı çok azdır (39). Bunların bir kısmında serum ALT düzeyi sürekli normal bulunurken bir kısmında zaman içinde ALT düzeyi yükselmektedir (39).

2.1.6 Tedavi

Akut hepatit C’de tedavi gerekip gerekmediği konusu yakın zamanlara kadar tartışmalıydı. Ancak araştırmalar göstermektedir ki akut evrede tedavi çok etkilidir ve kronikleşme riskinin %85’lerde olması nedeniyle tedavi yapılmasında yarar vardır (39).

Hepatit C enfeksiyonunda interferon alfa’nın yararlı etkileri ilk kez 1986 yılında rapor edilmiştir (39). 1990 yılında FDA tarafından hepatit C tedavisinde kullanım onayı verilmiştir (39). 1997 yılında Consensus Development Conference bu hastalığın

tedavisinde 3 milyon ünite (haftada 3 kez) 48 hafta boyunca interferon alfa kullanımını önermiştir (39). Bu dönemde en iyi tedavi rejimi olmakla beraber, kalıcı cevap oranı %12-16 aralığında saptanmıştır (39). İnterferon alfa tedavisine, ribavirin eklenmesi kalıcı cevap oranını %35-45'e yükseltmiştir (39). Buna rağmen doğal bu yanıt oranlarının tatmin edici bulunmaması, araştırmacıları yeni arayışlara itmiş ve pegylated interferonlar (peginterferon=PEG-İFN) ortaya çıkmıştır (37).

Günümüzde ise interferon-alfa yerine haftada bir kez pegylated-interferon kullanılması tedavinin başarı şansını arttırmaktadır. Tedavi en az 1 yıl sürdürülmelidir. Bazen 18 aya uzatılması da düşünülebilir. Böyle bir tedaviyi hastaların %80'i tamamlayabilmekte, ancak %20'lik bir kısımda ciddi ancak geri dönüşümlü yan etkiler nedeniyle tedavinin kesilmesi veya sub-terapötik dozlara düşürülmesi gerekebilmektedir (39).

2.1.7 Ribavirinin Metabolizması, Farmakokinetiği ve Hepatit C Virüsüne Karşı Antiviral Etki Mekanizması

İlk kez 1970'lerde sentezlenen ve bir guanozin analogu olan ribavirinin (1- β -D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-karbox-amid), hem in vitro hem de in vivo olarak bir kaç RNA ve DNA virüsüne karşı antiviral etkisi olduğu gösterilmiştir (43-45). Ribavirinin insanlarda kullanımı, ilk kez çocuklarda respiratuar sinsitiyal virüs enfeksiyonunu tedavi etmek için onaylanmıştır. Bugün ribavirin insanlarda Lassa ateşi, respiratuar sinsitiyal virüs ve HCV ile enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Şu an, 170 milyondan fazla kişide HCV enfeksiyonu olduğu tahmin edilmektedir (46). Vakaların ~%70-85'inde HCV enfeksiyonu kronikleşmektedir ve tedavi edilmezse, siroz, son evre karaciğer hastalığı ve transplantasyon gerektirebilen hepatosellüler karsinomaya neden olmaktadır (47). HCV enfeksiyonunda tedavi seçenekleri sınırlıdır. 1980'lerde HCV'nin tespitinden hemen sonra, HCV enfeksiyonunun tedavisi için interferon- α ile monoterapi denenmiş, fakat sınırlı bir başarı elde edilmiştir (48). 1990'larda, ribavirinin HCV'ye karşı etkisi test edilmiş (2,49). HCV hastalarında ribavirin monoterapisi kayda değer antiviral etki gösterememesine rağmen, interferon ile birlikte uzun süreli yanıtta çarpıcı bir iyileşme sağlamıştır (2,3).

Anti-HCV tedavisine uzun vadedeki virolojik yanıtlar, sürdürülebilir virolojik yanıt (SVY), tedavi sonu yanıt (TSY) ve yanıt alamama ile karakterizedir. SVY, tedavi sırasında plazmada HCV RNA'sının tespit edilemez olması ve tedavinin kesilmesinden en az 6 ay sonra bile bu durumun devam etmesi olarak tanımlanmaktadır (50). TSY, tedavi sona erdiğinde HCV RNA'nın tespit edilemez olmasıdır. Bu durumda, takiben HCV RNA tekrar ortaya çıkmaktadır. Yanıt alamama durumunda, tedavi boyunca HCV RNA'nın plazmada bulunmasıdır. Ribavirin ilavesinin çarpıcı etkisini ortaya çıkaran bir çalışmada, 24 haftalık standart interferon tedavisini takiben ribavirin ile SVY alınan hastaların oranı ~%6'dan ~%31'e çıkmıştır (3). 48 haftalık interferon tedavisini takiben, SVY ribavirin olmadan ~%13'e ve ribavirin ile ~%38'e çıkmıştır (3). Standart interferondan daha iyi farmakokinetik özellikleri olan "pegylated" interferon ile yanıt oranları artmıştır (51,52). Örneğin, 48 haftalık tedaviyi takiben, SVY ribavirin olmaksızın ~%29'a ve ribavirin ile ~%56'ya çıkmıştır (52).

Tedaviye yanıt alınamayanlar için başka bir alternatif yoktur (53,54). Küçük hayvan modellerinin ve etkili kültür sistemlerinin olmaması HCV'ye karşı yeni ilaçların geliştirilmesine engeldir ve HCV'nin antiviral ilaçlara karşı hızla rezistans mutasyonları kazanması ile ilgili endişeler artmıştır (53,54). Sonuç olarak, ribavirin ve "pegylated" interferon ile kombine tedavi, günümüzde HCV enfeksiyonunun standart tedavisi haline gelmiştir (51). Son on yıldır ribavirin yaygın olarak kullanılmasına rağmen, ribavirinin etki mekanizması henüz anlaşılammıştır (49,55,56). Ribavirinin farmakokinetik profilinde uzun süreli bir eliminasyon fazı vardır ve bu tam olarak açıklanamamıştır (11). Anti-HCV tedavisinde yaşamsal önemi olan interferon ve ribavirin arasındaki sinerji de belirsizdir (57).

HCV bir nonsitopatik virüstür. Bu nedenle her enfekte hepatosit yaşamı boyunca çok sayıda genç viriyonların oluşmasına neden olur. İnterferonun, enfekte hepatositlerdeki viral üretimi inhibe ederek etkisini gösterdiği düşünülmektedir (50,58). İnterferon bu etkisini dolaylı olarak, enfekte hepatositlerde viral protein sentezi ve viral RNA stabilitesini etkileyebilen non-spesifik anti-viral bir ortam oluşturan çok sayıda konak hücre genlerini uyararak gösterir (50). Ayrıca, interferon HCV'ye karşı etkisini immün sistemi etkileyerek gösterir, yani "bellek T hücre" proliferasyonu, "doğal öldürücü hücre" aktivasyonu, dendritik hücre matürasyonu ve T hücre apoptozis inhibisyonu ile etkisini gösterir (50). Sonuç olarak, interferon tedavisi başlar başlamaz

plazma HCV RNA miktarında çarpıcı bir azalma olur. Bir kısım hastada bu SVY'ta devam eder (59). Ribavirinin geniş anti-viral etki spektrumu bir kaç mekanizma ile açıklanabilir: viral RNA replikasyonunun direkt inhibisyonu, inosin-monofosfat-dehidrogenaz (IMPDH) enziminin inhibisyonu, immünomodülasyon ve mutasyon (50,55,56,60).

2.1.7.1 RNA Replikasyonunun Direkt İnhibisyonu

Ribavirin, hücrelerin içinde, ribavirin mono- (RMP), di- (RDP) ve trifosfata (RTP) fosforile olur (61). Bir guanozin trifosfat (GTP) analogu olan RTP, viral RNA polimeraz yoluyla replikasyon gösteren RNA iplikçikleri ile birleşir (61,62). Bu hatalı birleşme, zincirin uzamasını inhibe edebilir ve son safhada zincirin sonlanmasına neden olabilir (61,62).

2.1.7.2 IMPDH'nin İnhibisyonu

RMP, yeni GTP sentezi için önemli olan konak enzim IMPDH'yi inhibe ederek intrasellüler GTP havuzlarının tükenmesine sebep olabilir (55,63,64). GTP'nin tükenmesi viral replikasyonu iki şekilde etkileyebilir. İlk olarak, RNA sentezi için gerekli olan yeterli GTP desteği olmadığından dolayı viral replikasyonu inhibe edebilir. İkincisi, GTP yerine RTP ile birleşmeye neden olabilir ve böylece replikasyon sırasındaki hata oranını arttırabilir. Sonuçta, ribavirinin mutasyon yapan aktivitesine katkıda bulunur. Bu mekanizmaların her ikisinin de ribavirinin antiviral etkisine önemli ölçüde katkıda bulunup bulunmadığı açık değildir.

2.1.7.3 İmmunomodülasyon

İmmunomodülasyon etkisini, immün yanıtta T_h2 'den T_h1 'e geçişi başlatabildiği ileri sürülmüştür (50,55,65–67). Bir T_h1 eğilimi, enfeksiyona karşı antikor yanıtından

ziyade daha güçlü bir hücresele yanıt anlamına gelir. Gerçekten de, kombinasyon tedavisi alan hastalarda interferon tekli tedavisi alan hastalardan daha güçlü bir T hücre yanıtı gözlenmiştir, fakat bu, ribavirinin immünmodülasyon yoluyla etkisini göstermesinin bir göstergesi olmasından ziyade, azalan viral yükün bir etkisi olabilir (68).

Ribavirin monoterapisi SVY sağlamaz (49). İnterferonla birlikte ribavirin, interferon tekli tedavisine kıyasla SVY'ı kayda değer ölçüde iyileştirir (2,3). Bu gözlemler, interferon ve ribavirin arasında bir sinerjiyi düşündürmektedir. Ancak, ribavirinin interferon ile sinerjisi yoluyla immünmodülasyon oluşturduğuna dair kanıt yoktur.

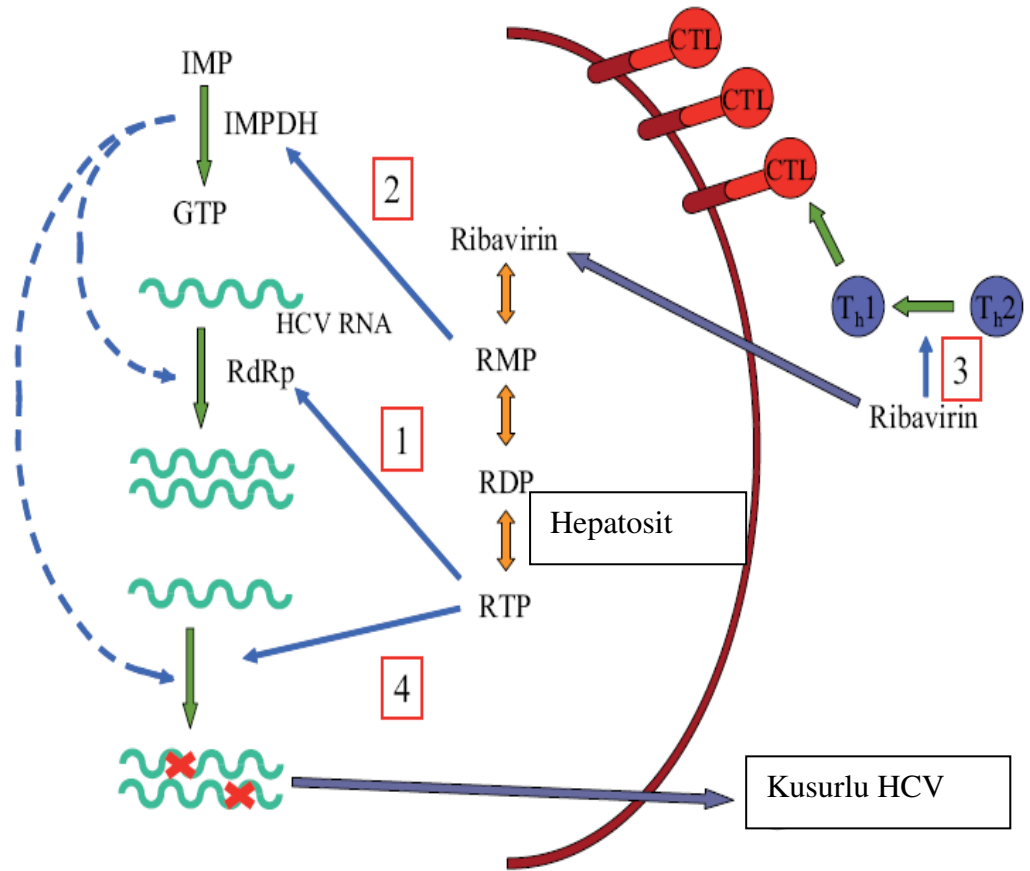
2.1.7.4 Mutasyon

RNA virüsleri, hataya çok meyilli replikasyon mekanizmaları nedeniyle genellikle "quasispecies" bağlantılı fakat aynı olmayan genom topluluğu olarak bulunurlar (69). "Quasispecies" varlığı, virüslere ihtiyaç duydukları çeşitliliği sağlar ve spesifik konak immün yanıtlarından ve ilaç tedavisinden kaçmalarını kolaylaştırır. Ancak, replikasyon sırasındaki hata oranı bir eşiği geçerse, "quasispecies" in bir hata felaketine sürüklenmelerine neden olabilir ve bu da genetik bilginin erimesiyle sonuçlanabilir (70,71). Ribavirinin, guanozin yerine yeni viral RNA iplikçikleri ile birleşerek viral replikasyon sırasındaki hata oranını arttırdığı bilinmektedir (72-74). Böylece ribavirin, bir hata faciası başlatarak virüsleri yok edebilir. Mutasyon hızında ribavirinin neden olduğu artış genetik bilginin tam olarak yok olmasını sağlamaya yetmese bile, daha yüksek bir mutasyon hızı, yeni hücreleri enfekte etmelerini ve/veya çoğalmalarını azaltarak artan yeni virionları defektif hale getirir.

Son bir kaç çalışma, ribavirinin antiviral etkisini mutasyon ile gösterdiği görüşüne destek vermektedir (74,75). Enfekte bireylerde HCV mutasyon oranlarındaki bir artışın direkt gözlenmesi hala bir sonuç vermemektedir (76,77). Young ve ark. (78) uzun süre ribavirin alan bireylerde HCV mutasyonlarında ılımlı bir artış olduğunu bulmuşlardır. Asahina ve ark. (79). HCV'nin NS5A ve NS5B bölgelerinde mutasyon oranlarında kayda değer bir artışa neden olduğunu ve bu artış ile SVY'ta artış arasında

güçlü bir korelasyon olduğunu bulmuşlardır. Ancak, diğer bazı araştırmacılar, ribavirinin başlattığı mutasyon oranlarında bir artış gözlemlememişlerdir (80,81). Artan kanıtlar, ribavirinin antiviral aktivitesinde anahtar mekanizmanın mutasyon olduğu yönündedir, henüz kanıtlar kesin değildir.

HCV'ye karşı ribavirinin antiviral aktivitesi için önerilen mekanizmalar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. HCV'ye karşı ribavirinin antiviral aktivitesi için önerilen mekanizmalar: (1) HCV replikasyonunu doğrudan inhibisyonu, (2) kısmen virus yapımını azaltabilen ve/veya RNA sarmalının replikasyonunda RTP'nin daha fazla inkorporasyonunu hızlandıran ve böylelikle mutagenezi artıran GTP azalmasına yol açan IMPDH enziminin inhibisyonu, (3) immün cevapta Th2'nin Th1'e kayması yoluyla immünomodülasyon ve (4) kusurlu progeny virionlara yolaçan mutagenezis. Th, T yardımcı hücreleri; CTL, sitotoksik T hücreleri; RdRp, RNA-bağımlı RNA polimeraz (57).

2.1.7.5 Farmakokinetik

Ribavirinin geniş anti-viral etki spektrumu bir kaç mekanizma ile açıklanabilir: viral RNA replikasyonunun direkt inhibisyonu, IMPDH enziminin inhibisyonu, immünomodülasyon ve mutasyon (50,55,56,60).

Ribavirin dolaşıma hızla geçer. İnce bağırsaktaki gastrointestinal N1 sodyum bağımlı nükleosit taşıyıcılar yoluyla aktif olarak taşınır (82). 600mg'lık dozu takiben, ortalama maksimum plazma konsantrasyonunun (C_{max}), 782 ngml⁻¹ olduğu gözlenmiştir (83). Maksimum konsantrasyona kadar geçen süre (t_{max}) ~1.5 saattir (83,84). Dağılım fazında yarılanma ömrü, ~3.7saattir (60). Eliminasyon fazı uzundur. Bu fazda, tek bir dozu takiben ortalama son konsantrasyon süresi ~100 saattir (60,85). Eliminasyon yarılanma ömrü 79 saattir (83). 200-1200mg doz aralığında, area under curve (AUC) ile dozaj arasında lineer bir ilişki vardır (57).

Birden fazla dozu takiben, ribavirin plazmada tedricen birikir ve ~4 hafta içinde maksimum asemptomatik konsantrasyona ulaşır (80,83). Haftada iki kere 600mg'lık birden fazla dozu takiben ortalama asemptomatik C_{max} 3677 ngml⁻¹'dir. Tek doza kıyasla, C_{max} 'da neredeyse 5 katlık bir artışı gösterir (83). Terminal eliminasyon fazı, ortalama $t_{1/2}$ ile birden fazla dozu takiben 274-298 saat aralığında uzar ve ribavirin dozu kesildikten sonra 4 hafta boyunca hala vücutta ribavirin bulunur (11,83).

Ribavirin renal eliminasyonun yanı sıra, metabolizma yoluyla da elimine olur. Renal eliminasyon tek dozun eliminasyonunun yaklaşık %5-15'inden sorumludur (84,85). Bu nedenle, metabolizmanın ribavirin eliminasyonunda anahtar bir rolü vardır diyebiliriz. Ribavirin metabolizması alanları henüz bilinmemektedir. Ribavirinin farmakokinetik profili, karaciğeri sağlıklı olanlar ve hepatik fonksiyon bozukluğu olanlarda aynıdır. Bu durum, ribavirinin metabolizmasında karaciğerin çok önemli bir yeri olmadığını düşündürmektedir (86).

Ribavirin plazma proteinlerine bağlanmaz ve muhtemelen bütün insanlarda var olan ekülibrium duyarlı (e_s) nükleosit taşıyıcı molekülleri ile hücreler içine taşınır (86). Bu nedenle ribavirin çeşitli hücrel kompartmanlar içine büyük ölçüde emilmektedir.

Jarvis ve ark. (86) in vitro olarak e_s nükleosit taşıyıcı molekülleri tarafından ribavirinin eritrositler içine taşınmasını incelemişlerdir. Ribavirin emilimi hızlı; hücre içi ribavirin konsantrasyonu, kısa sürede (~30saniye) lineer olarak yükselmiş, dakikadan

daha az bir sürede ekstrasellüler konsantrasyona ($\sim 5\mu\text{M}$) ulaşmıştır (86). Bu noktada, hücre içi konsantrasyon doymuş gibi görünmektedir. Bu nedenle, ribavirinin 22C° 'de ortalama $440\mu\text{M}$ 'lik Michealis-Menten benzeri bir sabiti (K_m) olan saturasyon içi akım mekanizması vardır denilebilir.

Ribavirin, hücre içinde adenzin kinaz ile RMP'ye fosforile olur, fakat adenzinden çok daha düşük bir oranda; adenzin ve ribavirinin fosforilasyon reaksiyonlarının hızları benzer, fakat ribavirinde K_m , adenzindeki 10000 kat daha fazladır (56,87). RMP, ribavirinin predominant hücre içi metaboliti olan RTP üreten nükleosit monofosfat ve difosfata daha fazla fosforile olur (88). RTP hücre içinde çok yüksek konsantrasyonlarda birikir ve fizyolojik konsantrasyonlarda ribavirin bulunan bir kültürde bir kaç saatlik bir inkübasyon sırasında $>100\mu\text{M}$ 'a ulaşır (89). Bu nedenle, ribavirinin hücre içi metabolizmasında, RMP'nin ribavirine fosforilasyonu kendi kendini sınırlayan bir basamak gibi görünmektedir (89).

Bir hücrenin nükleusu olmasına ya da olmamasına bağlı olarak, ribavirin hücre içinde geriye dönüşlü ya da dönüşsüz şekilde fosforile olur (57). Ribavirin hücre kültüründen alındığında, RTP nükleusu olan hücrelerde hızla fosforile oluyor gibi görünmektedir. Defosforilasyon yarılanma ömrü, 2 saatten daha azdır (90). Eritrositlerin nükleusu ve defosforilasyon enzimleri yoktur ve RTP aşırı miktarlarda birikir (90). e_s taşıyıcılar, fosforile olmuş ribavirin analoglarını taşıyamazlar (90). Bu nedenle, ribavirinin eritrositlerden eliminasyonu son derece yavaştır ve ~ 40 günlük bir yarılanma ömrü vardır. Bu da eliminasyonun splenik hemoliz yoluyla olduğunu düşündürmektedir (84). Bu yavaş eliminasyonun sonucunda, plazma ribavirin farmakokinetiğinde terminal eliminasyon fazı uzayabilir.

Ribavirinin eritrositlerde birikmesi, hemolitik anemiye de neden olur (55,84). RTP ve ATP arasındaki yapısal benzerlikten dolayı, yeterli birikmeyi takiben, RTP, hücrelerde ATP'ye bağımlı kullanımı hızla azaltabilir. Sonuç olarak, oksidatif solunumun etkilendiği ve eritrositlerin yaşam süresini kısalttığı düşünülmektedir (11). Bu nedenle, uzun süreli ribavirin dozu, hemolitik anemiye neden olabilir. Ancak bu yan etki geriye döndürülebilir çünkü ribavirinin kesilmesini takiben eritrosit sayısı eski haline dönmektedir (91,92).

Genellikle plazma içinde ilacın emilim ve eliminasyon sürecini kapsayan ilaç farmakokinetiğinin standart matematik modelleri, tek bir dozu takiben plazma ilaç

konsantrasyonlarında iki fazlı bir dönüşümü öngörmektedir (93,94). Bu nedenle, bu basit modeller ribavirinin üç fazlı farmakokinetik profilini yakalayamazlar ve daha karmaşık farmakokinetik modellere ihtiyaç vardır (84). Bir başka zorluk da, birden fazla doz ile birlikte eliminasyon yarılanma ömrü değiştikçe ortaya çıkar (11). Bu nedenle, tek doz farmakokinetiğini tanımlayan parametreler, birden fazla dozun farmakokinetiğine uygulanamayabilir. Deneysel ribavirin plazma konsantrasyon profillerine uygun olması için iki ve üç kompartman modellerini kullanılmıştır ve üç kompartman modelin mükemmel uyum sağladığı bulunmuştur. Ne var ki, bu kompartmaların fiziksel olarak neyi temsil ettiği açık değildir. Günümüzde, ribavirine özgü bilinen taşınma ve metabolik süreçlerle birlikte ilaç emilim ve eliminasyonunu kapsayan ribavirinin farmakokinetiğini açıklayacak mekanizma modelleri yoktur.

2.1.7.6 Antiviral Aktivite

Klinikte HCV RNA testi yapılmadan önce, ALT düzeyleri, HCV enfeksiyonu ve karaciğer hasarı için bir belirteç olarak kullanılıyordu. Hepatositlerin stoplazmalarında bulunan bu enzim, karaciğer fonksiyonları normal olan insanların serumlarında düşük düzeylerde bulunur. Hepatik hasarla, ALT karaciğerden sızar ve serum ALT düzeylerini yükseltir. İlginç bir şekilde, ribavirinin serum ALT düzeylerini kayda değer oranda düşürmesinin gözlenmesidir (49,95). 24 haftalık ribavirin monoterapisini takiben, hastaların %29'unda ALT düzeyleri normal ve %55'inden fazlasında da ALT'de bir düşüş yaşanmıştır (91). Ribavirinin bu etkisinin nedeni bilinmemektedir, ama ribavirinin antiinflamatuvar olması ve hücrel immün yanıtları daha az etkilemesi ile ilgili olabilir. Ribavirinin bu etkisini, Th2'den Th1'e geçişi başlattığı fikri ile ilişkilendirmek zordur, çünkü böyle bir geçiş hücrel immün yanıtları arttırabilir. Tedavinin kesilmesi, hastaların büyük bir kısmında ALT düzeylerini anormal oranda arttırmıştır (91,92). İnterferon ile birlikte, bir kaç ALT değişiklik paterni gözlenmiştir ve bu değişiklikler ribavirin varlığını çok da dikkate almadan, interferonun etkisinin viral kinetik modelleri ile yorumlanmıştır (96). Ribavirinin ALT üzerine etkileri henüz modelleme çalışmaları ile araştırılmamıştır.

Ribavirinin HCV RNA düşüşünü nasıl etkilediği çok net değildir. Ribavirin tekli tedavisinin, çok az hastada HCV RNA'sında küçük, geçici ve erken bir düşüş başlattığı bulunmuştur (80). Bu düşüşü sergileyen hastalarda, diğerlerine kıyasla ribavirinin plazma yarılanma ömrünün ve konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak, hiç bir hastada, uzun süreli bir yanıt oluşmamıştır. Bu da, ribavirin monoterapisi ile ilgili ilk klinik çalışmalarla uyumludur (49,95).

İnterferonla birlikte ribavirin, HCV RNA'sındaki ilk düşüşü etkilememektedir. Ancak, bazı vakalarda ribavirin ikinci aşamadaki düşüşü etkilemektedir (80,65). Yine de, yukarıda belirtildiği gibi, interferon tedavisinde uzun vadedeki yanıt oranlarındaki çarpıcı düzelme, ribavirin ilavesinden kaynaklanmaktadır (3,52).

Ribavirin tekli tedavisinde uzun vadedeki zayıf yanıtlar, ribavirinin tekli tedavideki etkinliğinin düşük olduğunu düşündürmektedir. Kombinasyon tedavisinde uzun vadedeki yanıt oranlarındaki artışı açıklamak için gerekli olan çok daha yüksek ribavirin etkinliği, ribavirin ve interferon arasında bir sinerjiyi düşündürmektedir. Bu sinerjinin kaynağı henüz bilinmemektedir. Bir açıklaması, ribavirinin interferona yanıt elemanlarını stimüle etmesi olabilir, fakat bu mekanizma da HCV için kesin değildir (60). Başka bir açıklaması, viral "fitness" (uygunluk, sağlık)'ın azaltılması yoluyla oluşan mutasyonun, HCV'nin genetik çeşitliliğini daraltması ve böylece HCV'nin interferonun başlattığı antiviral ve immün baskılardan kaçmasının azaltılması olabilir (50).

Son çalışmalar, ribavirinin antiviral rolünü aydınlatmada hızlı gelişmelere neden olmuştur. Artan kanıtlar, ribavirinin pek çok virüse karşı etkinliğinin altında yatan mekanizmanın mutasyon oluşumu olduğunu düşündürmektedir. Ancak bu mekanizmayı doğrulayacak sağlam kanıtlar hala yoktur. Ribavirinin farmakokinetiği ve antiviral etkisinin doza bağlı olduğu tespit edilmiştir ve tedaviye yanıtın iyileştirilmesi için olanaklar sunmaktadır. Ancak, ribavirinin plazma konsantrasyonlarının üç aşamalı farmakokinetik profilinin mekanizması hala kavranamamıştır. HCV'ye karşı ribavirin monoterapisinin etkisi çok azdır, fakat interferon ile kombine edildiğinde, yanıt oranları çarpıcı bir şekilde iyileşir. Viral dinamik modelleri, kombinasyon tedavisinde ribavirinin etkilerini açıklayabilmesine rağmen, ribavirin monoterapisinde viral yükteki geçici düşmeyi açıklayamıyoruz. Ribavirin ve interferon arasındaki sinerjinin kaynağı hala bilinmemektedir. Özellikle HCV için tedavinin optimizasyonu, ribavirinin antiviral

etkinliğinin, etki mekanizmalarının, farmakokinetik özelliklerinin, interferon ile etkileşiminin ve toksisite ve tolerans ilişkilerinin tam olarak kavranmasını gerektirir. Bu nedenle, gelecekte ribavirin ile ilgili araştırılması gereken daha çok şey vardır (97).

2.1.7.7 Kronik Hepatit C’de Tıbbi Tedavinin Hematolojik Yan Etkileri

Kronik HCV ile enfeksiyonun tedavisi son bir kaç yılda çok büyük değişiklikler göstermiştir. Şu an mevcut olan en etkin tedavi, peginterferon ve ribavirin kombinasyonudur. Büyük ölçekli klinik çalışmalar, 48 haftalık bir kombinasyon tedavisini takiben hastaların %42-51’inde uzun süreli bir virolojik yanıt (SVY) alındığını göstermiştir (52,98,99). HCV genotip 2 ya da 3’lü hastalarda SVY %80’e yaklaşmaktadır ve yeni bir çalışma, bunun yalnızca 24 haftalık peginterferon ve daha düşük ribavirin dozuyla başarılabilirliğini ileri sürmektedir (99).

HCV tedavisinin kullanımını sınırlayan başlıca faktörlerden biri hem peginterferon hem de ribavirinin sayısız yan etkiye neden olmasıdır (100). Bu yan etkilerden en yaygın olanları, gripi andıran semptomlar, hematolojik, nöropsikiyatrik ve dermatolojik toksisiteler ve otoimmün bozukluklardır. Çoğu hasta, tedavinin yan etkilerini tolere edebilmekte ve tedavinin tamamını almaktadır. Tedavi kesilir kesilmez, bu yan etkiler kaybolmaktadır. Ancak, hastaların yaklaşık %25-33’ünde şiddetli yan etkiler görülmektedir ve nadir durumlarda bazı yan etkiler yaşamı tehdit etmektedir. Klinik yönden önemli yan etkilerin ele alınmasında standart yaklaşım, peginterferon ve/veya ribavirin dozlarının azaltılmasıdır. Dozun azaltılması, yan etkileri ortadan kaldırmazsa ya da yan etkiler şiddetleniyorsa, tedavinin kesilmesi gerekebilir. Ne yazık ki, son kanıtlar, HCV tedavisinin erken kesilmesi ya da dozun azaltılmasının SVY’ta belirgin azalmaya neden olduğunu göstermektedir (101). Bu özellikle, optimum virolojik yanıt elde etmek için tam doz tedavi gerektiren HCV genotip 1’li hastalarda belirgindir. Buyüzden, peginterferon ve ribavirinin yan etkilerinin farkedilmesi ve tedavisi önemlidir. Yan etkilerin uygun şekilde ele alınması, tedavinin kesilmesini önleyebilir ve peginterferon ve ribavirin tedavisini takiben SVY elde etme olasılığını arttırabilir.

Peginterferon ve ribavirin tedavisi esnasında anemi, nötropeni ve trombositopeni yaygındır. Nötropeni ve trombositopeni, interferonun neden olduğu kemik iliği süpresyonunun direkt sonucudur (102-104). Çoğu çalışma, total nötrofil ve platelet sayısının tedavi öncesi düzeye göre yaklaşık olarak %20 kadar düştüğünü göstermektedir (52,98,100,103). Bu genellikle tedavinin ilk 4-8 haftasında olur ve tedavinin geri kalan kısmında değişmez. Bu düşmeye rağmen, peginterferon alan hastaların çoğunda nötrofil ve platelet sayıları normal sınırlar içinde kalmaktadır.

Sirozlu hastalarda nötrofil sayısı sıklıkla normal sınırlarda ya da normalden düşüktür ve peginterferon tedavisi sırasında daha fazla düşer. İlaveten, Afrika kökenli pek çok kişide, esansiyel nötropeni vardır ve bunlarda peginterferon tedavisi sırasında belirgin nötropeni gelişme riski de vardır (105). İlaç üreticileri, mutlak nötrofil sayısı 1.500 hücre/mm³'ün altına düşerse peginterferon dozunun düşürülmesini önermesine rağmen, bu ajanı kullanan tecrübeli pek çok doktora göre, tedavinin kesilmesinden ya da dozun düşürülmesinden önce 750-500 hücre/mm³ nötrofil değerleri tolere edilebilmektedir. İlk çalışmalar, ileri derecede siroz ya da kararlı Child A sirozu olan hastalarda bile, bakteriyel enfeksiyonlar ve interferonun neden olduğu nötropeni arasında bir bağlantı göstermemiştir (106). Bu nedenle, interferon alan hastalarda, granülosit koloni stimüle eden faktör gibi nötrofil stimüle eden faktörlerin kullanımı nötrofil sayısını artırıyor gibi görünmesine rağmen, bu ajanların sirozlu hastalarda bile klinik olarak faydalı olması mümkün değildir (107,108). İstisna, interferonun neden olduğu nötropeni varlığında bakteriyel enfeksiyon riski artmış gibi görünen dekompanse (irreversibil) sirozlu hastalardır (109).

Sirozlu hastalarda bile, spontan kanamayla trombositopeni peginterferona cevap olarak nadiren meydana gelir (100,102). İlaç üreticileri platelet sayısı 75.000/mm³'ün altına düşerse, dozun azaltılmasını önermesine karşın, tecrübeli doktorlar dozu azaltmak ya da tedaviyi kesmek için platelet sayısının 25.000-30.000'e düşmesini beklemektedirler. Bunun tek istisnası, interferonun neden olduğu immün trombositopenidir (ITP) (110). Platelet sayısında ani bir düşüş ile genellikle 30.000/mm³'ten az seviyelere düşüş ile karakterizedir ve genellikle interferon tedavisi başladıktan sonraki 4-8 hafta içinde meydana gelir. İnterferonun başlattığı ITP'li hastaların hepsinde anti-platelet antikorlar saptanamayabilir. Şüphelenilirse, interferon derhal kesilmeli ve platelet yakından izlenmelidir. Bazı hastalarda, interferon

kesildikten sonra platelet sayısı artmaz ve kortikosteroid başlanması gerekebilir. İlk epizot iyileşse bile ve platelet sayısı tedavi öncesi düzeylere gelse bile, interferonun neden olduğu ITP sonraki interferon tedavisi için bir kontrendikasyondur.

Peginterferon ve ribavirin ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %75'inde hemoglobinde 2gr ya da daha fazla bir düşüş gözlenmektedir (52,98,100,103). Bu durum, ribavirinin başlattığı hemoliz ve kompensatuar retikülozisi engelleyen interferonun neden olduğu kemik iliği süpresyonunu takiben meydana gelir (111,112). Ribavirin, metabolize olmadan böbreklerden atıldığı için, hafif renal yetmezliği olan hastalarda bile, serum ribavirin düzeyleri hızla yükselir ve bu durum şiddetli hemolize sebep olur (113). Sonuç olarak, belirgin renal yetmezliği olan hastalarda ribavirin kullanılmamalıdır.

Peginterferon ve ribavirin ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %40'ında anemi gelişir ve anemi ya semptomatiktir ya da hastaların %20-25'inde ribavirin dozunun azaltılmasını gerektirecek kadar şiddetlidir (52,98,100,103). İlaç üreticileri, hemoglobin düzeyleri 10gm/dL'in altına düştüğünde ribavirin dozunun azaltılmasını önermesine rağmen, pek çok hasta hemoglobin düzeyleri 12gm/dL'in altına düştüğünde semptomları sergilemektedir. Hemoglobin düzeyleri 8.5gm/dL'in altına düştüğünde hem interferon hem de ribavirin kesilmelidir.

2.1.7.8 Dozun Azaltılmasının SVY'a Etkisi

Kronik HCV için tedavi alan hastaların %25-33'ünde interferon ve/veya ribavirin dozunun azaltılması gerekmektedir. İnterferon dozunun azaltılmasının en yaygın sebepleri, gripi andıran yan etkiler, depresyon, otoimmün belirtiler, nötropeni ve trombositopenidir. Ribavirin dozunun azaltılmasının en yaygın sebepleri, anemi ve döküntüdür. Ne yazık ki, tedavi tamamlanmadan önce, peginterferon ve ribavirin dozlarının azaltılması ya da tedavinin kesilmesi, SVY'ta azalmaya neden olmuştur (111,114,115). Bunu gösteren ilk çalışmada, interferon ve ribavirin dozları birlikte azaltılmıştır ve bu ilaçlar birlikte kesilmişlerdir ve her bir medikasyon birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmemiştir ya da doz azaltılması ve tedavinin kesilmesi ayrı ayrı değerlendirilmemiştir (101). Doz azaltılmasına gidilmeyen ve tedaviyi tamamlayan

hastalarda, SVY %61 idi. Bu oran, 12. haftadan sonra dozun azaltıldığı hastalarda %50 ve 12. haftadan önce doz azaltılan hastalarda %34 olmuştur.

Daha yeni iki çalışmada, tedavinin ilk 12-20 haftasında ribavirin dozunun azaltılmasının erken virolojik yanıtı (EVY) ve SVY'ü belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir (114,115). Ancak, peginterferon dozunun azaltılmasının, EVY ve SVY'ı belirgin olarak azaltıyor gibi görünmemiştir. Daha da önemlisi, HCV RNA kaybolduktan sonra peginterferon ya da ribavirin dozunun azaltılması, SVY'ü olumsuz etkilememiştir.

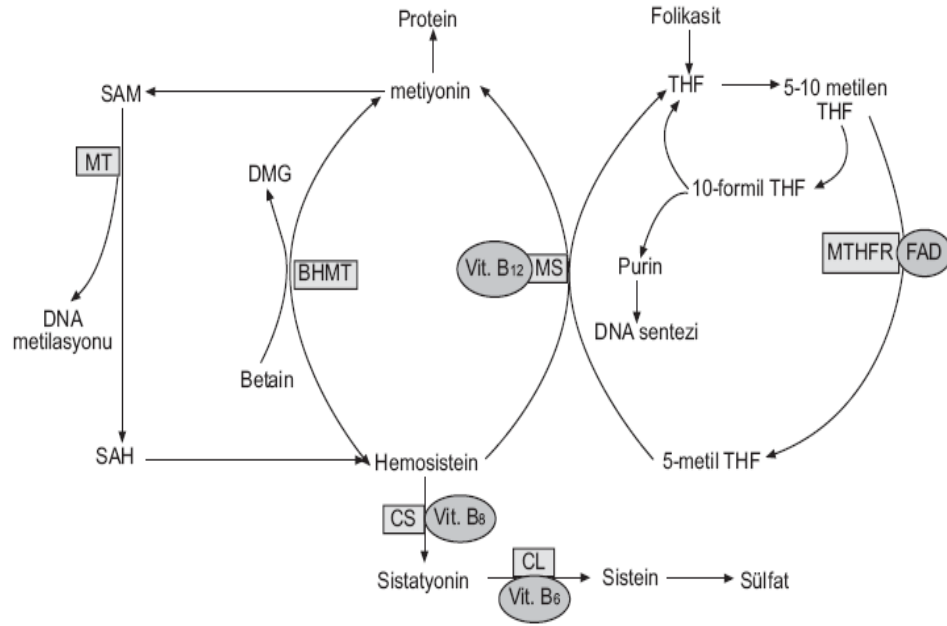
Doz azaltılmasının SVY üzerine etkisinin ilk kez araştırıldığı çalışmalarda, nötropeni, trombositopeni ve anemi doz azaltılmasını gerektiren başlıca endikasyonlardır (52,98). Bu çalışmalarda, peginterferon dozu, %50 kadar azaltılmıştır ve ribavirin günde 1.000 ya da 1.200mg'dan 600mg'a düşürülmüştür. Bu çalışmalarda dozdaki bu büyük düşüşlerin nedeni, esas olarak güvenlidir. Ancak, pratikte pek çok tecrübeli doktor, dozu daha az miktarlarda azaltmaktadırlar. Anemi, hem ribavirinin başlattığı hemoliz hem de interferonun başlattığı kemik iliği baskılanmasının sonucu olduğu için, ribavirin yerine peginterferon dozunun azaltılması anemiye düzeltilebilir ve ribavirin dozunu düşürme ihtiyacını ortadan kaldırabilir.

2.2 Metilen Tetrahidrofolatredüktaz Enzimi ve Genetik Özellikleri (EC 1.5.1.20)

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, folat metabolizmasında önemli bir enzimdir (18,19). İnsan MTHFR geni, kromozom 1p36.3'de lokalize olmuştur ve 656 aminoasitten oluşan MTHFR enzimini kodlar (19). MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) geridönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür (19-21). Aktivitesi folat koenzimlerinin homosisteinin remetilasyon yoluna girişi için kontrol noktasını oluşturur (116). Saflaştırılmış enzim 77 kDa molekül ağırlıklı iki eşit alt birimli bir dimerdir; bunlardan her biri 1M kovalent bağlanmamış flavinadenin dinükleotid içerir (116). Flavın NADPH eşdeğerlerinin doğal süstrata veya yapay sistemlerde menadion gibi alternatif elektron alıcılarına indirgenmesinde aracı rol oynar. AdoMet'in bağlanması allosterik inhibisyona yol açar ve AdoHcy ile geri döndürülebilir (116). Bu özellik N-terminal 40

kDa ile C-terminal 37 kDa bölgeleri arasında gerçekleşen triptik kesim ile kaybolur (116).

Enzim sitoplazmik bir protein olup, iki alt birimden oluşan homodimer yapıdadır (117). MTHFR enzimi, homosisteinin remetilasyon döngüsünde (homosistein, transsülfürasyon ve remetilasyon yollarını kullanarak metabolize olur) görev yapar (117).(Şekil 2.2)



Şekil 2.2. Homosistein'in transsülfürasyon ve remetilasyon metabolize yolları. (MTHFR: metilentetrahidrofolat redüktaz, MS: Metiyonin sentetaz CS: Sistolonyin β sentetaz, CL: Sistolonyin γ liyaz, BHMT: Betain homosistein metil transferaz, MT: Metil transferaz SAM: S-adenozilmetiyonin, SAH: S-adenozilhomosistein THF: Tetrahidrofolat, DMG: Dimetilglisin). Vücuttaki homosistein transsülfürasyon veya yeniden metilasyon (remetilasyon) yollarını kullanarak metabolize olur. *Transsülfürasyon yolunda;* homosistein, vitamin B6 bağımlı bir enzim olan sistatyonin β sentetaz katalizörülüğünde sistatyonin'e, o da sisteine hidrolize olur. Bu sistein de daha sonra sülfata hidrolize olarak idrarla atılır. *Remetilasyon yolunda;* homosisteinden, metiyonin'in yeniden sentezi iki farklı yolla gerçekleşir. Kısa yolda; betain homosistein metiltransferaz (BHMT) enzimi, bir metil vericisi olan betainin metil grubunu, homosisteine aktararak metiyonin oluştururken kendisi dimetilglisine dönüşür. Uzun yolda; 5-metiltetrahidrofolat bir metil grubu vericisidir. 5,10 metilentetrahidrofolat, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi aracılığıyla 5-metiltetrahidrofolata dönüşür. Metilen, metil grubundan daha yükseltgenmiş olduğundan metilentetrahidrofolatın hem bir karbon verici hemde bir hidrid iyonu tedarik edici rolü vardır. 5-metiltetrahidrofolatın bir metil grubu, kobalamin (vitamin B12) bağımlı enzim olan metiyonin sentaz aracılığı ile homosisteine aktarılarak metiyonin oluşturulurken diğer taraftan da tetrahidrofolat meydana gelir. Bu tetrahidrofolat tekrar 5-10 metilentetrahidrofolata dönüşür. Fazla metiyoninin bir kısmı proteinlerin yapısına katılırken, bir taraftan da SAM'ı, o da SAH'ı meydana getirir (22,26,27,29,117).

İnsan MTHFR geninin N-terminal ucunun yapısı tamamen açıklanamamıştır (26,28-30). MTHFR geninin promotör bölgesi, transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için belirli konsensus dizilerine sahipken TATA kutusu içermez (19). Bu gen bölgesinde alternatif kaynaşma (splicing) olayları meydana gelmekte ve bunun sonucunda, değişik dokularda, farklı MTHFR transkriptleri (3 transkript) oluşmaktadır (28-30).

İnsan ve fare MTHFR geni üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda MTHFR geninde 15 farklı polimorfizm belirlenmiştir (117). MTHFR geninde meydana gelen bir polimorfizm (en yaygın olanı C677T polimorfizmi) enzim aktivitesini azaltmaktadır (22). Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5-metil THF düzeyi azalmakta, 5,10-metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır (18,20,22,116,117). 677 T/T homozigotluğu aktivitede yaklaşık %50 azalma ve termolabilitede artışa yol açar ve düşük folat durumu varlığında total plazma Hcy'de hafif artışlara neden olabilir (89). A1298C varyantı aktivitede yaklaşık %35 azalmaya yol açar ancak plazma total Hcy'sini etkiliyor gibi görünmemektedir (116).

C677T polimorfizmi, MTHFR proteinin N-terminal katalitik bölgesini etkileyen 4. ekzonda meydana gelir (27,30). MTHFR C677T polimorfizminde, MTHFR enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan C (sitozin)'in →T (timin)'e değişimi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonu vardır (118). Bu mutasyon, genin ürünü olan proteinin 226. pozisyonunda alanin'in yerine valin'in geçmesine neden olur (117). Bunun sonucu MTHFR aktivitesi azalır (117). Azalan MTHFR aktivitesi, 5-metil tetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve bunun sonucu olarak da homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artmaya neden olur (117). MTHFR'nin C677T polimorfizminde, C/C (alanin/alanin) homozigot normal, C/T (alanin/valin) heterozigot ve T/T (valin/valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir (25,117).

MTHFR geninde belirlenen başka bir polimorfizm de, enzimi kodlayan genin 7. ekzondaki 1298.nükleotid olan A(adenin)'in C (sitozin)'e değişimi sonucu, MTHFR proteinindeki glutamin'in alanin'e değişimine neden olan nokta mutasyonudur ve enzimin C-uç regülatör bölgesinde etkilidir (29,117). Bu polimorfizmde de diğer polimorfizm tipinde olduğu gibi MTHFR aktivitesi azalır (29,117). A1298C polimorfizminin, plazma homosistein konsantrasyonundaki artışı MTHFR C677T

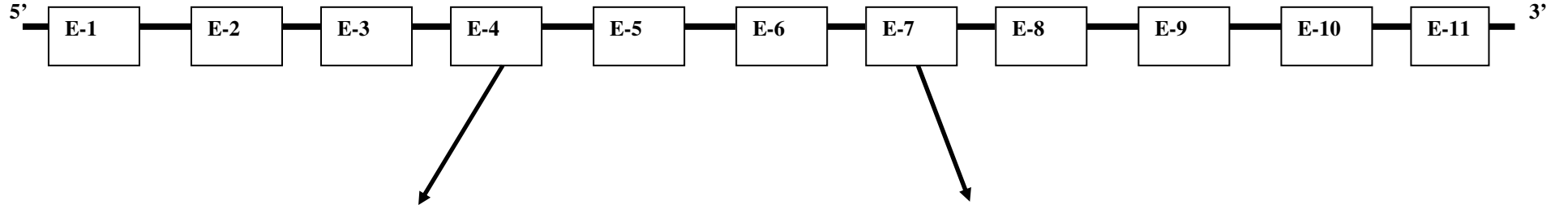
polimorfizmi kadar etkilemediği ileri sürülse de, bu polimorfizmin önemi henüz tam olarak açıklanamamıştır (29,117). A1298C polimorfizmi, MTHFR enziminin C-uç regülatör bölgesinde meydana gelmesine karşılık, C677T mutasyonu genin N-uç katalitik bölgesinde meydana gelmekte ve bu nedenle A1298C polimorfizimli bireylerde MTHFR enzim aktivitesindeki azalma C677T polimorfizimli bireylerin enzim aktivitesinden daha az olmaktadır (25,27,29,31,118). Daha önceki çalışmalarda da C677T polimorfizminin MTHFR aktivitesinde önemli bir etkiye sahip olduğu açıklanmıştır. Hem heterozigot 677C/T hem de homozigot mutant 677T/T genotiplerinde, MTHFR enzim aktivitesi homozigot atasal tip (677C/C) genotipe göre önemli derecede düşüktür. 677T/T genotipi, termolabile MTHFR enzim özelliğine sahiptir (118).

A1298C ve C677T polimorfizmlerinin birlikte heterozigot olduğu durumda, MTHFR enzim aktivitesi, her iki allelin normal homozigot olduğu durumdaki enzim aktivitesinin %50-60'ı kadardır (31). Bu aktivite, C677T polimorfizminin heterozigot bireylerinin enzim aktivitesinden daha düşüktür (31). 677C/C, 1298C/C genotipine sahip bireylerde 677C/C, 1298A/A genotipli bireylere göre plazma total homosisteininde azalma olduğu açıklanmıştır. Tek başına C677T homozigot polimorfizimli (T/T) genotipine sahip bireylerde de plazma homosisteini önemli düzeyde artmaktadır (29). van der Put ve ark. (36) yaptıkları bir çalışmada, her iki polimorfizm bakımından çift heterozigot olan (1298A/C ve 677C/T) bireylerde total plazma homosistein konsantrasyonunun önemli derecede arttığını belirtmişlerdir.

A1298C polimorfizminde azalan enzim aktivitelere rağmen ısı inkübasyonundan sonra 1298A/C genotipleri arasında artan aktivasyon yüzdesinde önemli bir farklılık görülmediği için, bu polimorfizmin enzimin termostabilitesini etkilemediği bildirilmiştir (118). A1298C polimorfizminde MTHFR aktivitesinde önemli etkiler görülmesine rağmen ne 1298A/C, ne de 1298C/C genotipinde artan homosistein düzeylerine rastlanmamıştır (118). 677C/C, 1298A/C ve 677C/C, 1298C/C genotiplerinde MTHFR aktiviteyi, 677C/C, 1298A/A genotip enzim aktivitesi ile karşılaştırıldığında sırasıyla %60-92 ve %52-66 olarak bulunmuştur (118). Heterozigot (677C/T, 1298A/C) genotip durumunda MTHFR aktivitesi ise 677C/C, 1298A/A genotipi ile karşılaştırıldığında, %36-62 olarak bulunmuştur (118).

Bizim alışmamızda ekson 4'te C677T polimorfizmi ve ekson 7'deki A1298C polimorfizmini tespit için kullandığımız primer dizileri başlangıç, bitiş noktaları ve enzim tanıma bölgeleri, kesim noktaları aşağıda belirtilmiştir (şekil 2.3).

MTHFR geni 1p36.3'de lokalizedir (19,119,120).



Ekson 4'te 677. nükleotitte C→T değişimi

```
TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGCA↓GCCGATTTTCATCATCACG
CAGCTTTTCTTTGAGGCTGACACATTCTTCCGCTTTGTGAAGG
CATGCACCGACATGGGCATCACTTGCCCCATCGTCCCCGGGA
TCTTTCCATCCAGGTGAGGGGCCAGGAGAGCCCATAAGCT
CCCTCCACCCCACTCTCACCGCACCGTCCT
```

Ekson 7'de 1298. nükleotitte A→C değişimi

```
GGGGTCAGGCCAGGGGCAGGGGATGAACCAGGGTCCCCACT
CCAGCATCACTCACTTTGTGACCATTCCGGTTTGGTTCTCCCG
AGAGGTAAAGAACGAAGACTTCAAAGACACTTTCT↓GCACTG
GTCAGCTCCTCCC
```

şekil 2.3: MTHFR Geni ve çalışılan Polimorfizim Bölgeleri (primerler kırmızı renk ile enzim tanıma bölgeleri mavi ve kesim noktası ok ile gösterilmiştir).

2.3 S-Adenozil Homosistein Hidrolaz Enzimi ve Genetik Özellikleri

Homosistein (Hcy) metabolizması esansiyel asit metionin metabolizması ile karmaşık biçimde ilişkilidir ve insanlardaki hücrel homeostazda yaşamsal rol oynar. Metionin protein sentezi için gereklidir, yaşamsal metillenmiş bileşiklerin birçoğunun sentezinde metil grupları vericisidir, kükürtün (inorganik sülfat) majör kaynağıdır, kükürt içeren diğer aminoasitlerin (sistation, sistein, taurin) öncü molekülüdür ve poliamin sentezi için karbon iskeletini oluşturur (121). Hcy folat metabolizmasında ve kolin katabolizmasında öncü rol oynar (121).

Metionin ilk önce metionin adenziltransferaz ile aktif formu S-adenozilmetionine dönüştürülür (122). Bu, önemli pek çok metillenmiş bileşiğin enzimatik sentezi için metil grubu verir; örneğin kreatin ve metillenmiş DNA (122). Memelilerde bu tip en az 39 AdoMet'e bağımlı metiltransferaz tanımlanmıştır ve doğrulanmayı bekleyen başka birçokları da vardır (122). Bu reaksiyonlarının her birinin ürünü S-adenozilhomosisteindir (AdoHcy); bu madde AdoHcy-hidrolaz tarafından adenozin ve Hcy'ye hidrolize edilir (122). Hcy daha sonra iki yönde tekrar metabolize edilir (122). Metionin sentetaz ile katalizlenen karmaşık bir 5-metiltetrahidrofolata bağımlı reaksiyonda tekrar metilasyon ile metionine dönüştürülerek korunabilir (122). Bu enzim ikinci bir enzim, metionin sentetaz redüktaz ile indirgenerek metillenir; bu reaksiyon kobalamin (B12 vitamini) ve AdoMet gerektirir. MTHFR aracılığıyla 5,10-metilentetrahidrofolattan 5-metiltetrahidrofolat üretilir. Hcy betain metiltransferaz ile metionine tekrar metillenebilir; bu reaksiyon metionin sentetazın yaygın doku dağılımına karşıt olarak sadece karaciğer, böbrek ve beyinde gerçekleşir (116).

2.3.1. AdoHcy Hidrolaz (EC 3.3.1.1)

1989 yılında Hershfield (123) ve Coulter-Karis (124) plasentadan insan AHCY'ı için cDNA'yı izole etmişlerdir. Memeli dokularında yaygın biçimde dağılmış olan bu enzim insan plasentası dahil olmak üzere birçok kaynaktan saflaştırılmıştır (123,124). Molekül ağırlığı 180-200 kDa arasında olan bir tetramer şeklinde bulunan bir sitozolik

proteindir, 10 eksondan oluşur ve her alt birim bir NAD⁺ molekülü içerir ve adenozin için bir bağlanma bölgesine sahiptir (32).

Bu reaksiyonun termodinamikleri AdoHcy sentezini güçlü biçimde tetikler ancak her iki ürün hızla uzaklaştırıldığından, in vivo koşullarda AdoHcy'nin yıkımı genellikle ağırlıklıdır. İnsan cDNA'sı 2084 nükleotid içerir ve molekül ağırlığı 47,660 olan 432 aminoasitlik bir protein kodlar, rat proteini ile %97 benzerdir. Gen kromozom 20cen-q13.1'e lokalize edilmiştir (124). Birçok türden klonlanan enzim yüksek düzeyde homoloji gösterir ve ortak bir özellik 426. aminoasit pozisyonunda bulunan bir lizindir; bu, katalitik aktivite için önemlidir (125).

AdoHcy, AdoMet'e bağımlı tüm metiltransferazlar tarafından üretilir ve metiltransferazların güçlü bir inhibitörüdür (126). AdoMet/AdoHcy oranı (>4/1) normal düzeyinin altına düştüğünde, birçok metiltransferaz %10-60 arasında azalmalar ile değişen derecelerde azalmış aktivite gösterir (126).

Mohandas ve ark. (127) AHCY lokusunu 20cen-q13.1'e ve ADA geni için 20q13.1-q ter'de göstermişlerdir. Eiberg ve Mohr (128) bu enzimlerin polimorfizmleri için 8 Danimarkalı ailenin verilerinde ADA ve AHCY arasındaki ilişkiye bakmışlardır. Rekombinasyon fraksiyonu erkeklerde 0.4, kadınlarda 0.08 ve her iki cins birlikte 0.13 olduğu hesaplanmıştır. Kloor ve ark.(129) Hırvatistan'da 237 kişinin kan örneklerini incelemişler; 4 farklı elektromorfik AHCY varyantını tanımlamışlardır. AHCY *4 yeni bir varyanttır ve 0.015 sıklıkta bulunmuştur. AHCY*1, AHCY*2 ve AHCY *3 için gen sıklıkları sırasıyla şöyledir; 0.941, 0.032 ve 0.006 (129). Araştırmacılar belirgin olarak azalmış enzim aktivitesine sahip bir sessiz allel saptamışlar ve buna AHCY*0 demişlerdir. AHCY *0 için sıklık 0.006'dır. Bu toplumda homozigot AHCY eksikliği için beklenen sıklık 1:30000 olarak saptanmıştır (129).

Coulter-Karis (124) ve Hershfield (123) yaklaşık 48kDa ağırlığındaki 432 aminoasitlik bir proteini kodlayan 1299 bp'lik bir transkripti saptamışlar ve bu transkriptin nükleotid 256'da bir G→A transisyonu bildirmişlerdir. Ancak, daha geniş bir grupta ne AHCY dizin verisi ne de bu 256 G→A transisyonun sıklık verisi elde edilememiştir.

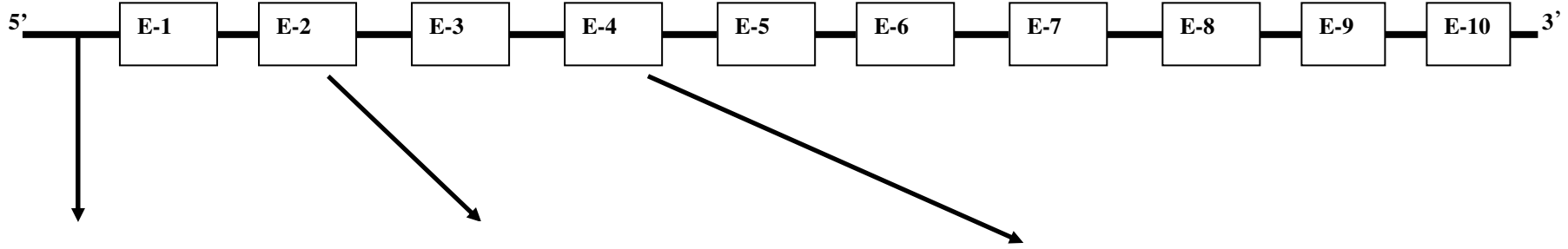
Bir Tunuslu ailenin 3 kızında büyüme geriliği, mental ve motor retardasyon, fasyal dismorfizm, anormal saç ve diş yapısı ve miyokardiyopati ile ilişkili hipermetiyonemi saptanmıştır (130). Karaciğer AHCY aktivitesi bu 3 çocukta %80

azalmış bulunmuş, ayrıca neonatal kolestaz da tespit edilmiştir (130). Muhtemelen o da etkilenen dördüncü kız kardeş ise 9 aylık iken karaciğer yetmezliğinden öldüğü düşünülmüştür (130).

Baric ve ark. (131) AHCY eksikliği olan bir Hırvat çocukta, AHCY geninde 2 mutasyon için karma heterozigozite saptamışlardır. Baric ve ark. (131) AHCY eksikliğinin patolojik etkisinin temelini tartışmasında, AdoHcy tarafından inhibe edilen çeşitli AdoMet bağımlı metiltransferazları işaret etmişlerdir. DNA metilasyon biçimlerindeki değişikliklerin kalıtsal olabileceğine ve embriyogenez sırasında ve doğum sonrası doku spesifik gen sunumunu negatif yönde etkileyebileceğine dikkat çekmişlerdir (131). Uygun mutasyon yoluyla genlerin sessizleşmesi somatik mutasyonların fonksiyonel karşılığı olduğu için, DNA metilasyon biçimlerinin kalıtımı normal genomik metilasyon biçimlerinin tamirinin oluşmayabileceğini ileri sürülmüştür (131). Bu gende mutasyonları ve şiddetli hipermetioninemi hastalığı olan bir hastanın yakın tarihteki keşfi bu enzimin hücresel homeostazdaki rolünü vurgulamaktadır (131).

Bizim çalışmamızda 5' UTR -34 C→T dönüşümü, ekson 2 Arg38Trp 112 C→T dönüşümü ekson 4 Try143Cys A→G dönüşümünü tespit için kullandığımız primer dizileri başlangıç, bitiş noktaları ve enzim tanıma bölgeleri, kesim noktaları aşağıda belirtilmiştir (şekil 2.4).

AHCY gen 20cen-q13.1'e lokalizedir (124,132,133)



5' UTR -34 C→T dönüşümü

CCCCCGCCACGAACAAGCCCCGG
GCGGG↓TGCCGGGCGGCCGCAAC
CGGCTGCAGGTCCTGGGACTCAC
CGACTTTGTAGGGCAGTTTGTGAG
ACATGCTGGCGGCACTCGTGATAA
ACGGGCGAAGGGGGCTGGGCCTC
AGTCTGG↓GAACAGGAACTGGGG
GGCAGCGCCGAG**CAGGGATATGC**
GGCTGGCG

Ekson 2 Arg38Trp 112 C→T dönüşümü

GTGACCGCCCCTCTTGGTTGGTGGGAT
GAGGGGACTCACGGAACCTCCACCTGT
TTCCTCCCGTAGCCGACATCGGCCTGG
CTGCCTGGGGACGCAAGGCCCTGGACA
TTGCTGAGAACGAGATGCCGGGCCTGA
TGCGTATGCGGGAG↓CGGTACTCGGCC
TCCAAGCCACTGAAGGGCGCCCGCATC
GCTGGCTGCCTGCACATGACCGTGGAG
ACGGCCGTCTCATTGAGACCCTCGTC
ACCCTGGGTGCTGAGGTGAGGCCACA
GCTGTATCACCCAGAGTCCTTGCCCTC
CCTGGGTTAGCCAGGGAA**GAAGACGA**
CTGTGCCAGGGTGG

Ekson 4 Try143Cys A→G dönüşümü

GTTGGGAAGGAGGTAGTTTTGGCTCTGCCAGA
GTTGTTCCCTGGAGCAGGTACCAGTTGGGAAG
TCCAGGCCCTGATGTGCCACTCACCTCCAGT
GTATGCCTGGAAGGGCGAAACGGACGAGGAGT
ACCTGTGGTGCATTGAGCAGACCCTGTACTTC
AAGGACGGGCC↓CTCAACATGATTCTGGACG
ACGGGGCGACCTACCAACCTCATCCACACC
AAGTACCCGCAGCTTCTGCCAGGTGAGCAGGG
CGGGGCAGGTGGGCTGGGTGCTGGTGGCCTG
GGTGGGGCCTGTTTGCCACATGATGGCCGCA
GGCCTGGCAG**GACTCCCATCACCTCAAGCAGC**

Şekil 2.4: AHCY Geni ve Çalışılan Varyasyon Bölgeleri (primerler kırmızı renk ile, enzim tanıma bölgeleri mavi, değişim noktası sarı ve kesim noktası ok ile gösterilmiştir).

3- GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Hastaların Toplanması

Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji polikliniğine başvuran, kronik C hepatiti tanısı almış ve interferon (klasik ve peglenmiş) ile birlikte ribavirin – vücut ağırlığına göre ayarlı doz; <65kg ise 800mg/gün, 65-85kg ise 1000mg/gün ve ≥ 85 kg ise 1200mg/gün- tedavisi almış olan 85 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların verileri Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji kliniği hepatoloji kayıt dosyalarından geriye dönük taranarak temin edildi. Hemogloblin seviyelerinde ≥ 2 gramlık düşme tedaviye bağlı anemi yönünden anlamlı kabul edildi. Buna göre hastalar anemi gelişen ve gelişmeyen olarak iki gruba ayrıldı. Hemogloblin değerinin en fazla düştüğü değer ve tarih hafta olarak kaydedildi. Başlangıç hemogloblin değerinden hemogloblinin en fazla düştüğü değer çıkarılarak delta hemogloblin değeri saptandı. Tüm hastaların başlangıç hemogloblin, platelet sayısı, AST, ALT, GGT ve LDH değerleri ile vücut kitle indeksi [Vücut ağırlığı (kilogram) /Boy(metre)²] kaydedildi. Ribavirine ek olarak aldıkları tedaviler klasik interferon ve peglenmiş interferon olarak kaydedildi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Etik Komitesinin izni (06.03.2006-8) alındıktan sonra tüm katılımcılara bilgi verilerek çalışma öncesi yazılı ve sözlü onamları alındı.

Hastalardan DNA izolasyonu için 7-8 ml venöz kan 1 ml % 2'lik etilendimetiltetraasetik asitli (EDTA) içeren, 15 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. DNA izolasyonuna kadar -20 °C de saklandı. Bu kanlardan tuz çöktürme yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı.

3.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1 Aletler ve Cihazlar

- Termal Cyclers (Techne Flexigene, Cambridge,UK)
- Elektroforez tankı (EC Midicell EC 350, 10x20cm)
- Elektroforez Güç Kaynağı (EC 135-90)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve MK 418)
- Mikrodalga Fırın (Alaska)
- Hassas terazi (AND GR-200)
- Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- Vorteks (VELP)
- Santrifüj (Nüve NF 800)
- Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Derin Dondurucu (Arçelik-2031 D)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)

3.2.2 Kimyasal Maddeler

- Na₂EDTA (Sigma E-5134)
- Sodyum Perklorat (Sigma S-3546)
- Sodyum Dodesil Sülfat, SDS (Sigma L-5750)
- Sodyum Klorür (Riedel-de Haen)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Parafilm M (Sigma, P-7793)
- Taq DNA Polimeraz (MBI Fermentas, EP0402)
- Bidistile Su (Sigma W-3500)

- 2 mM dNTP Mix (MBI Fermentas, #R0241)
- Hinf I (Fermentas, ER0801)
- Sat I (Fnu4HI Fermentas, ER1642)
- Mnl I (Fermentas, ER1072)
- Mbi I (BsrB1 Fermentas ER1271)
- Sdu I (Bsp1286 I, Fermentas, ER0651)
- 10X PCR Buffer with (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas #B33)
- 25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas)
- Proteinaz-K (Sigma P-2308)
- Primerler
 - MTHFR C677T polimorfizimi için;
 - Forward 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'
 - Reverse 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'
 - MTHFR A1298C polimorfizimi için;
 - Forward 5'-GGGAGGAGCTGACCAGTGCAG-3'
 - Reverse 5'-GGGGTCAGGCCAGGGGCAG-3'
 - AHCY-1 5' UTR -34 C→T dönüşümü için;
 - Forward 5'-CGCCACGCGCATATCCCTG-3'
 - Reverse 5'-CCCCCGCCACGAACAAGC-3'
 - AHCY-2 Ekson 2 Arg38Trp 112 C→T dönüşümü için;
 - Forward 5'-GTGACCGCCCCTCTTGGTTGG -3'
 - Reverse 5'-CCACCCTGGCACAGTCGTCTTC-3'
 - AHCY-4 Ekson 4 Try143Cys A→G dönüşümü için;
 - Forward 5'-GTTGGGAAGGAGGTAGTTTTGGC -3'
 - Reverse 5'-GCTGCTTGAGGTGATGGGAGTC -3'
- Tris-Hidroklorid (Sigma T-7149)
- Trizma Base (Sigma T-6066)
- Borik Asit (Carlo Erba 302177)
- Ethidium Bromide (Sigma E-1510)
- Orange G (Sigma O-3756)
- Gliserol (Merck 4091)
- Agarose plus (Prona E.U)

- 100 bp DNA ladder GeneRuler marker (MBI, # SM 0241)

3.2.3 Çözeltiler

▪ Nuklei Lizis Tamponu

Tris-HCl 1.576 gr

NaCl 23.4 gr

Na₂EDTA 0.7 gr

1 lt distile suya tamamlanıp çözdükten sonra, otoklavda sterillendi ve +4 °C'de saklandı.

▪ TE (Tris-HCl) Tamponu

Tris-HCl 0.394 gr

Na₂EDTA 0.093 gr

250 ml distile suya tamamlanıp çözdükten sonra, otoklavda sterillendi ve +4 °C'de saklandı.

▪ 10XTBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu

Trizma Base 108 gr

Borik asit 54.8 gr

Na₂EDTA 5.44 gr

Distile su ile 1lt'ye tamamlanarak çözüldü.

▪ Orange G çözeltisi

Na₂ EDTA 2,232 gr

Orange G 200 mg

60 ml Gliserol ve 40 ml distile sudan oluşan solusyon içerisinde çözüldü.

▪ Elektroforez Yürütme Tamponu

10X TBE tamponundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1XTBE içerisine 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde ethidium bromide (EtBr) konularak hazırlandı.

▪ %2'lik Agaroz Jel Solüsyonu

140 ml 1X TBE tamponu içerisinde 2.8 agaroz plus mikrodalga fırında eritildikten sonra 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde EtBr eklenerek, hazırlandı

▪ **%3'lük Agaroz Jel Solüsyonu**

140 ml 1X TBE tamponu içerisinde 4.2 gr agaroz plus mikrodalga fırında eritildikten sonra 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde EtBr eklenerek, hazırlandı.

▪ **%3.5'lük Agaroz Jel Solüsyonu**

140 ml 1X TBE tamponu içerisinde 4.9 gr agaroz plus mikrodalga fırında eritildikten sonra 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde EtBr eklenerek, hazırlandı.

▪ **10 mg/ml Proteinaz K Cözeltisi**

100 mg Proteinaz K, 10 ml steril distile su ile çözülerek hazırlandı ve -20 °C'de saklandı.

▪ **5M Sodyum Perklorat Solüsyonu**

61.2 gr sodyum perklorat (NaClO₄) 1 lt'ye distile suyla tamamlanıp, çözdükten sonra otoklavda sterillendi ve +4 °C'de saklandı.

▪ **%10 SDS Solüsyonu**

10 gr SDS 100 ml distile suda çözüldü.

▪ **6 M NaCl Solüsyonu**

35,5 gr NaCl 100 ml distile suda çözüldü.

3.3. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu tuz çöktürme yöntemine göre elde edildi. Yöntemin esası, lökositlerde bulunan DNA dışındaki tüm yapıların bozularak parçalanması, yoğun bir tuz çözeltisi ile çöktürülmesi ve üstte kalan sıvı kısımda bulunan DNA'nın etil alkol yardımı ile yoğunlaşması sağlanarak izole edilmesidir (135).

3.3.1 DNA İzolasyonunun Yapılışı

DNA izolasyonu işlemi iki gün sürmektedir. Bu işlemin ilk aşamasında; kanların bulunduğu tüpler soğuk steril distile su ile 14 ml'ye tamamlanıp kuvvetlice 1-1.5 dakika çalkalandıktan sonra 15 dakika 2000 rpm'de ilk santrifüj işlemi yapıldı. Tüplerde çökelmelerin başladığı bölgenin yakınına kadar olan süpernatant kısım, pastör pipetiyle alınarak atıldı. Çökeltinin üstüne steril soğuk distile su eklenerek hacmi tekrar 14 ml'ye tamamlandı. Tüm tüplerde bu işlem yapıldıktan sonra 10 dakika 2000 rpm de ikinci santrifüj işlemi yapıldı. Tekrar süpernatant atılarak, çökelti üzerine steril soğuk distile su eklendi ve kuvvetlice çalkalandı. Çalkalama işlemi yapılırken tüpün dibinde çökelti kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra tekrar su eklenerek 14 ml'ye tamamlandı ve santrifüj edildi. Bu işlemler süpernatantın rengi, şeffaf bir renge gelinceye kadar devam etti. Bu işlem yaklaşık 4-5 defa tekrarlandı.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, tüplere pipetle 3'er ml nuklei lizis buffer konulup çalkalandıktan sonra tüplerin her birine 200 µl SDS, 500 µl 5 M'lık Sodyum Perklorat ve 25 µl, 10 mg/ml'lik Proteinaz-K konuldu. Kapaklar sıkıca kapatılıp tüplerin ağzı parafilm ile sarıldıktan sonra 37 °C'lik etüvde bir gece bekletildi..

İkinci gün, tüpler 37 °C'lik etüvden çıkarılıp çalkalanarak, 55 °C'lik inkübatöre konuldu. Bir saat geçtikten sonra her bir tüpe 2'şer ml doymuş NaCl₂ çözeltisi konuldu. Kapaklar kapatılıp tüpler hızlıca çalkalandıktan sonra 10 dakika bekletildi. Daha sonra 15 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüplerde bulunan süpernatantlar, boş santrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerine soğuk, etanol eklenerek, çözülmüş haldeki DNA'nın yoğunlaşması sağlandı. Yoğunlaşan DNA'ların her biri, mikropipet yardımıyla, içerisinde 500 µl TE tamponu bulunan ependorf tüplerine

aktarıldı. Ependorf tüpleri, DNA'ların TE tamponu içerisinde çözünüp, homojen hale gelmesi için de 37 °C'lik etüvde bir gece bekletildikten sonra +4 °C'deki buzdolabına kaldırıldı.

Eğer, DNA aynı gün içinde elde edilmek isteniyorsa, bu durumda ilk gün işlemleri yapılır ve 55 °C'de 3 saat bekletildikten sonra, ikinci gün işlemleri yapılarak DNA elde edilir.

3.4 Moleküler Analiz

3.4.1 MTHFR Gen Polimorfizmleri

3.4.1.1. MTHFR C677T Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

PCR, tek bir molekül DNA'yı dahi çoğaltabileceğinden, reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olmasının engellenmesi gerekmektedir. Bu kontaminasyon, daha önceki PCR reaksiyonu, eksojen DNA veya diğer hücrel materyallerden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle, kullanılan sarf malzemeleri ve solüsyonların steril olmasına dikkat edildi. Ayrıca PCR reaksiyonunda, ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNAase ve RNAase enzimlerinden arındırılmış steril 0,5 ml'lik PCR tüpleri (Axygen Thin-Walled PCR Tubes), reaksiyonun gerçekleştirilmesi için Thermal Cycler cihazı ve 0,5-10 µl'lik, 2-20 µl'lik ve 10-100 µl'lik otomatik pipetler kullanıldı.

Çalışmamızda öncelikle, MTHFR C677T polimorfizimi için 198 bp'lik gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR yapıldı. MTHFR C677T polimorfizimi için kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (23,24).

Forward 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'

Reverse 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

PCR reaksiyon karışımı yaklaşık 19 örnek için aşağıdaki gibi hazırlandı.

1-Bidistile Su	255 µl
2-10x PCR Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	38 µl
3- dNTP Mix (2 mM)	38 µl
4- Primer F	7.5 µl
5- Primer R	7.5 µl
6-MgCl ₂	22 µl
7- Taq DNA Polimeraz (5ünite/µl)	3µl
8- Hedef DNA	0,9 µl

Hazırlanan PCR karışımından, her bir 0,5 ml'lik ince çeperli eppendorf tüpüne 18 µl konulduktan sonra tüpler thermal cycler'a konuldu. Termal cycler'da, önce 1 döngü 2 dak. 95°C de ilk denatürasyon, sonra 35 döngü; 45 sn 95°C'de denatürasyon, 1 dak. 60°C'de bağlanma (annealing), 1,5 dak. 72°C'de sentez (extension) ve 1 döngü 7 dak. 72°C' de son sentez (final extension) aşamaları gerçekleştirildi. Yapılan PCR işlemi sonrasında, ürün oluşup oluşmadığını tespit etmek için, %3'lük agaroz jelde elektroforez işlemi yapıldı. Oluşması beklenen, 198 bp'lik DNA parçacığı gözlemlendi.

PCR aşaması sonucunda elde edilen 198 bp'lik PCR ürünü, bize sadece polimorfizmin olduğu bölgenin dizisini vermektedir. Ancak, bizim tespit etmeye çalıştığımız tek nükleotid değişimi olduğu için bu bölgeyi tanıyan bir RE enzimi kullanılarak alel tespiti yapıldı. Bu işlem için Hinf I enziminden oluşan bir karışım hazırlandı. 10 örnek için; 95 µl bidistile su, 25 µl buffer R ve 100 ünite Hinf I'den (G↓ANTC) oluşan enzim karışımı hazırlandı (Enzim tanıma bölgesindeki N=A,G,C veya T anlamına gelir). 8 µl PCR ürünü bulunan her bir tüpe, 10.4 µl hazırlanan RE enzim karışımından eklendi ve 1 gece 37°C etüvde bekletilerek kesme işlemi gerçekleştirildi.

Kesme işlemi gerçekleştirildikten sonra, tüplerin her birine 10 µl orange G eklendi. Sonra, %3'lük agaroz plus jel hazırlandı. Her bir tüpten 30 µl alınarak jel kuyucuklarına yüklendi. Sonra 120 V elektrik akım uygulanarak elektroforez işlemi yapıldı.

Kesme işlemi sonucunda C aleline sahip gen bölgeleri kesilmezken, T aleline sahip gen bölgeleri kesildi. Sonuçta, genotipleme aşağıdaki gibi yapıldı.

C aleli	198 bp	C/C genotipi	198 bp
T aleli	175 bp ve 23 bp	C/T genotipi	198 bp, 175 bp, 23 bp
		T/T genotipi	175 bp ve 23 bp

3.4.1.2 MTHFR A1298C Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda, MTHFR A1298C polimorfizimi için 138 bp'lik gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR yapıldı. MTHFR A1298C polimorfizimi için kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (22).

Forward 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'

Reverse 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

PCR reaksiyon karışımı yaklaşık 10 örnek için aşağıdaki gibi hazırlandı.

1-Bidistile Su	170 µl
2-10x PCR Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	25 µl
3-dNTP Mix (2 mM)	25 µl
4-Primer F	2.5 µl
5-Primer R	2.5 µl
6-MgCl ₂	15 µl
7-Taq DNA Polimeraz (5ünite/µl)	1.2 µl
8-Hedef DNA	0.7 µl

Hazırlanan PCR karışımından, her biri 0,5 ml'lik ince çeperli eppendorf tüpüne 23 µl konulduktan sonra tüpler thermal cycler'a konuldu. Termal cycler'da, önce 1 döngü 2 dak. 95°C de ilk denatürasyon, sonra 35 döngü; 45 sn 95°C'de denatürasyon, 30 sn. 64°C'de bağlanma (annealing), 1 dak. 72°C'de sentez (extension) ve 1 döngü 7 dak. 72°C' de son sentez (final extension) aşamaları gerçekleştirildi. Yapılan PCR işlemi sonrasında, ürün oluşup oluşmadığını tespit etmek için, %3.5'luk agaroz jelde elektroforez işlemi yapıldı. Oluşması beklenen, 138 bp'lik DNA parçasığı gözlemlendi.

PCR aşaması sonucunda elde edilen 138 bp'lik PCR ürünü, bize sadece polimorfizmin olduğu bölgenin dizisini vermektedir. Ancak, bizim tespit etmeye çalıştığımız tek nükleotid değişimi olduğu için bu bölgeyi tanıyan bir RE enzimi kullanılarak alel tespiti yapıldı. Bu işlem için Sat I (Fnu4HI) enziminden oluşan bir karışım hazırlandı. 10 örnek için; 95 µl bidistile su, 25 µl buffer G ve 100 ü Sat I (Fnu 4HI)'dan (GC↓NGC) oluşan enzim karışımı hazırlandı (N=A,G,T veya C anlamındadır). 13 µl PCR ürünü bulunan her bir tüpe, 12 µl hazırlanan RE enzim karışımından eklendi ve 1 gece 37°C etüvde bekletilerek kesme işlemi gerçekleştirildi.

Kesme işlemi gerçekleştirildikten sonra, tüplerin her birine 10 µl orange G eklendi. Sonra, %3.5'lük agaroz plus jel hazırlandı. Her bir tüpten 30 µl alınarak jel kuyucuklarına yüklendi. Sonra 120 V elektrik akım uygulanarak elektroforez işlemi yapıldı.

Kesme işlemi sonucunda A aleline sahip gen bölgeleri kesilmezken, C aleline sahip gen bölgeleri kesildi. Sonuçta, genotipleme aşağıdaki gibi yapıldı.

A aleli	138 bp	A/A genotipi	138 bp
C aleli	119 bp ve 19 bp	C/C genotipi	119 bp ve 19 bp
		A/C genotipi	138 bp, 119 bp, 19 bp

3.4.2 AHCY Gen Dönüşümleri

3.4.2.1. AHCY-1 5'UTR -34 C→T Dönüşümünün Belirlenmesi

Çalışmamızda, AHCY-1 5'UTR -34 C→T dönüşümü için 195bp'lik gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR yapıldı. AHCY-1 5'UTR -34 C→T dönüşümü için kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (32).

Forward 5'-CGCCACGCGCATATCCCTG-3'

Reverse 5'-CCCCCGCCACGAACAAGC-3'

PCR reaksiyon karışımı yaklaşık 20 örnek için aşağıdaki gibi hazırlandı.

1-Bidistile Su 340 µl

2-10x PCR Buffer (NH₄)₂SO₄ 50 µl

3-dNTP Mix (2 mM)	50 µl
4-Primer F	10 µl
5-Primer R	10 µl
6-MgCl ₂ (25mM)	30 µl
7-Taq DNA Polimeraz (5ünite/µl)	4 µl
8-Hedef DNA	1 µl

Hazırlanan PCR karışımından, her biri 0,5 ml'lik ince çeperli eppendorf tüpüne 23 µl konulduktan sonra tüpler thermal cycler'a konuldu. Termal cycler'da, önce 1 döngü 2 dak. 95°C de ilk denatürasyon, sonra 35 döngü; 45 sn 95°C'de denatürasyon, 1 dak. 58°C'de bağlanma (annealing), 1.5 dak. 72°C'de sentez (extension) ve 1 döngü 7 dak. 72°C' de son sentez (final extension) aşamaları gerçekleştirildi. Yapılan PCR işlemi sonrasında, ürün oluşup oluşmadığını tespit etmek için, %3'lük agaroz jelde elektroforez işlemi yapıldı. Oluşması beklenen, 195 bp'lik DNA parçacığı gözlemlendi.

PCR aşaması sonucunda elde edilen 195 bp'lik PCR ürünü, bize sadece polimorfizmin olduğu bölgenin dizisini vermektedir. Ancak, bizim tespit etmeye çalıştığımız tek nükleotid değişimi olduğu için bu bölgeyi tanıyan bir RE enzimi kullanılarak alel tespiti yapıldı. Bu işlem için Mnl I enziminden oluşan bir karışım hazırlandı. 10 örnek için; 95 µl bidistile su, 25 µl buffer G ve 100 ünite Mnl I'den (CCTC(N)₇ ↓) oluşan enzim karışımı hazırlandı (N= A, G,T veya C anlamına gelir). 13 µl PCR ürünü bulunan her bir tüpe, 12 µl hazırlanan RE enzim karışımından eklendi ve 1 gece 37°C etüvde bekletilerek kesme işlemi gerçekleştirildi.

Kesme işlemi gerçekleştirildikten sonra, tüplerin her birine 10 µl orange G eklendi. Sonra, %3.5'lük agaroz plus jel hazırlandı. Her bir tüpten 30 µl alınarak jel kuyucuklarına yüklendi. Sonra 120 V elektrik akım uygulanarak elektroforez işlemi yapıldı.

Kesme işlemi sonucunda C aleline sahip gen bölgeleri tek noktadan kesilirken, T aleline sahip gen bölgeleri 2 noktadan kesildi. Sonuçta, genotipleme aşağıdaki gibi yapıldı.

C aleli	148 bp ve 47 bp	C/C genotipi	148 bp ve 47 bp
T aleli	121 bp, 47 bp ve 27 bp	C/T genotipi	148 bp, 121 bp, 47 bp, ve 27 bp
		T/T genotipi	121 bp, 47 bp, ve 27 bp

3.4.2.2. AHCY-2 Ekson 2 Arg38Trp 112 C→T Dönüşümünün Belirlenmesi

Çalışmamızda, AHCY-2 ekson 2 112 C→T bölgesinin amplifikasyonu için PCR yapıldı. AHCY-2 ekson 2 112 C→T bölgesi için kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (32).

Forward 5'-GTGACCGCCCCTCTTGGTTGG -3'

Reverse 5'-CCACCCTGGCACAGTCGTCTTC-3'

PCR reaksiyon karışımı yaklaşık 20 örnek için aşağıdaki gibi hazırlandı.

1-Bidistile Su	340 µl
2-10x PCR Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	50 µl
3-dNTP Mix (2 mM)	50 µl
4-Primer F	10 µl
5-Primer R	10 µl
6-MgCl ₂ (25mM)	30 µl
7-Taq DNA Polimeraz (5 ünite/µl)	4 µl
8-Hedef DNA	1 µl

Hazırlanan PCR karışımından, her bir 0,5 ml'lik ince çeperli eppendorf tüpüne 23 µl konulduktan sonra tüpler thermal cycler'a konuldu. Termal cycler'da, önce 1 döngü 2 dak. 95 °C de ilk denatürasyon, sonra 35 döngü; 45 sn 95°C'de denatürasyon, 1 dak. 58°C'de bağlanma (annealing), 1.5 dak. 72°C'de sentez (extension) ve 1 döngü 7 dak. 72°C' de son sentez (final extension) aşamaları gerçekleştirildi. Yapılan PCR işlemi sonrasında, ürün oluşup oluşmadığını tespit etmek için, %2'lik agaroz jelde elektroforez işlemi yapıldı. Oluşması beklenen, 338 bp'lik DNA parçacığı gözlemlendi.

PCR aşaması sonucunda elde edilen 338 bp'lik PCR ürünü, bize sadece polimorfizmin olduğu bölgenin dizisini vermektedir. Ancak, bizim tespit etmeye çalıştığımız tek nükleotid değişimi olduğu için bu bölgeyi tanıyan bir RE enzimi kullanılarak alel tespiti yapıldı. Bu işlem için Mbi I (BsrB1) enziminden (GAG↓CGG) oluşan bir karışım hazırlandı. 10 örnek için; 95 µl bidistile su, 25 µl buffer tango ve 10 µl Mbi I 'den oluşan enzim karışımı hazırlandı. 13 µl PCR ürünü bulunan her bir tüpe,

12 µl hazırlanan RE enzim karışımından eklendi ve 1 gece 37°C etüvde bekletilerek kesme işlemi gerçekleştirildi.

Kesme işlemi gerçekleştirildikten sonra, tüplerin her birine 10 µl orange G eklendi. Sonra, %3'lük agaroz plus jel hazırlandı. Her bir tüpten 30 µl alınarak jel kuyucuklarına yüklendi. Sonra 120 V elektrik akım uygulanarak elektroforez işlemi yapıldı.

Kesme işlemi sonucunda T aleline sahip gen bölgeleri kesilmezken, C aleline sahip gen bölgeleri kesildi. Sonuçta, genotipleme aşağıdaki gibi yapıldı.

C aleli	189 bp ve 149 bp	C/C genotipi	189 bp ve 149 bp
T aleli	338 bp	T/C genotipi	338 bp, 189 bp, 149 bp
		T/T genotipi	338 bp

3.4.2.3. AHCY-4 Ekson 4 Try143Cys A→G Dönüşümünün Belirlenmesi

Çalışmamızda, AHCY-4 ekson 4 Try143Cys A→G bölgesinin amplifikasyonu için PCR yapıldı. AHCY-4 ekson 4 Try143Cys A→G bölgesi için kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (32,132).

Forward 5'GTTGGGAAGGAGGTAGTTTTGGC -3'

Reverse 5'-GCTGCTTGAGGTGATGGGAGTC -3'

PCR reaksiyon karışımı yaklaşık 20 örnek için aşağıdaki gibi hazırlandı.

1-Bidistile Su	340 µl
2-10x PCR Buffer(NH ₄) ₂ SO ₄	50 µl
3-dNTP Mix (2 mM)	50 µl
4-Primer F	7 µl
5-Primer R	7 µl
6-MgCl ₂	30 µl
7-Taq DNA Polimeraz (5ünite/µl)	3 µl
8-Hedef DNA	1 µl

Hazırlanan PCR karışımından, her bir 0,5 ml'lik ince çeperli eppendorf tüpüne 23 µl konulduktan sonra tüpler thermal cycler'a konuldu. Termal cycler'da, önce 1 döngü 2 dak. 95°C de ilk denatürasyon, sonra 35 döngü; 45 sn 95°C'de denatürasyon, 1 dak. 58°C'de bağlanma (annealing), 1.5 dak. 72°C'de sentez (extension) ve 1 döngü 7 dak. 72°C' de son sentez (final extension) aşamaları gerçekleştirildi. Yapılan PCR işlemi sonrasında, ürün oluşup oluşmadığını tespit etmek için, %2'lik agaroz jelde elektroforez işlemi yapıldı. Oluşması beklenen, 350 bp'lik DNA parçacığı gözlemlendi.

PCR aşaması sonucunda elde edilen 350 bp'lik PCR ürünü, bize sadece polimorfizmin olduğu bölgenin dizisini vermektedir. Ancak, bizim tespit etmeye çalıştığımız tek nükleotid değişimi olduğu için bu bölgeyi tanıyan bir RE enzimi kullanılarak alel tespiti yapıldı. Bu işlem için Sdu I (Bsp 1286 I) enziminden oluşan bir karışım hazırlandı. 10 örnek için; 95 µl bidistile su, 25 µl buffer Sdu I ve 50 ünite Sdu I (Bsp1286 I)'den oluşan enzim (GDGCH↓C) karışımı hazırlandı (D=A,G veyaT; H=A,C veya T anlamına gelir). 13 µl PCR ürünü bulunan her bir tüpe, 12 µl hazırlanan RE enzim karışımından eklendi ve 1 gece 37°C etüvde bekletilerek kesme işlemi gerçekleştirildi.

Kesme işlemi gerçekleştirildikten sonra, tüplerin her birine 10 µl orange G eklendi. Sonra, %3'lük agaroz plus jel hazırlandı. Her bir tüpten 30 µl alınarak jel kuyucuklarına yüklendi. Sonra 120 V elektrik akım uygulanarak elektroforez işlemi yapıldı.

Kesme işlemi sonucunda A aleline sahip gen bölgeleri tek noktadan kesilirken, G aleline sahip gen bölgeleri 2 noktadan kesildi. Sonuçta, genotipleme aşağıdaki gibi yapıldı.

A aleli	179 bp ve 171 bp	A/A genotipi	179 bp ve 171 bp
G aleli	171 bp, 120 bp ve 59 bp	A/G genotipi	179 bp, 171 bp, 120 bp ve 59 bp
		G/G genotipi	171 bp 120 bp ve 59 bp

3.5. İstatistiksel Analiz

Anemi ile dikkate alınan risk faktörleri arasındaki ilişki multiple binary lojistik regresyon modeli ile belirlenmiştir. Genotiplerin Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı ki-kare testi ile incelenmiştir. Delta değerleri açısından genotiplerde heterozigot olan ve normallerin karşılaştırılmasında ve 3 genotipin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. En fazla hemoglobin düşüşü delta Hb, ribavirin dozunda azaltma ve ribavirinin kesilmesi yönünden ve cinsiyetler arasındaki karşılaştırmalar ki-kare testi ile yapılmıştır. Hesaplamalar sonucunda $P < 0.05$ ise istatistik olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veri analizinde SPSS (sürüm 11.5) programı kullanılmıştır.

4-BULGULAR

Bu çalışmada, MTHFR C677T, MTHFR A1298C genlerine ait polimorfizmleri belirlemek ve AHCY-1 5'UTR -34 C→T, AHCY-2 112 C→T, AHCY-4 143 A→G varyasyonlarının belirlenmesi için, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji polikliniğine başvuran, kronik C hepatiti tanısı almış ve interferon (klasik ve peglenmiş) ile birlikte ribavirin tedavisi verilmiş olan 85 hasta çalışmaya dahil edildi. PCR ve RFLP yöntemleri ile MTHFR C677T, MTHFR A1298C genlerine ait polimorfizmlerin ve AHCY-1 -34 C→T, AHCY-2 112 C→T, AHCY-4 143 A→G genlerine ait varyasyonların alel ve genotipleri tespit edildi. Hemogloblin seviyelerinde ≥ 2 gramlık düşmeye göre hastalar anemi gelişen ve gelişmeyen olarak iki gruba ayrıldı. Anemi sıklığını 52/85 (% 61.17) olarak bulduk. Ribavirin dozu azaltılan hasta sayısı 31 (% 36.47) idi ve 9 (% 10.58) hastada ribavirin kesildi. İki grup arasında risk faktörlerine bakıldığında sadece yaş açısından belirgin bir ilişki olduğu belirlendi. Yaş arttıkça anemi riski 1.112 (OR) kat artmaktaydı ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.009$). Anemi gelişmeyen gruptaki 33 bireyin yaş ortalaması; 48.51 ± 8.15 'e karşılık; anemi gelişen gruptaki 52 bireyin ise 53.01 ± 8.21 idi ($p=0.016$). Gruplar arasında cinsiyet, vücut kitle indeksi, hemogloblin düzeyi, platelet sayısı, ALT, AST, GGT, LDH, interferonun tipi ve bakılan gen polimorfizmleri ve genetik varyasyonlar yönünden bir ilişki bulunamamıştır (Çizelge 4.1).

Değerlendirilen 85 HCV'li bireyin 55'i bayan, 30'u erkekti. Kadınların yaş ortalaması 52.74 ± 8.55 , erkeklerin yaş ortalaması 48.56 ± 7.64 olarak bulundu ($p=0.028$). Cinsiyetle aneminin gelişimi arasında bir ilişki yoktu ($p=0.737$). Anemi gelişen grupta 25'i kadın, 3'ü erkek 28 (28/52, % 55.76) hastanın ribavirin dozu azaltılmıştı ve anemi gelişmeyen grupta 3'ü de kadın 3 hastanın (3/33, % 9.09) ribavirin dozu azaltılmıştı. Bu fark anlamlıydı ($p=0.001$). İlaç kesilen 9 hastanın 9'u da kadındı ve anemi gelişen grupta yer alıyordu ($p=0.019$). Gen polimorfizmlerinin genotipleri ve alelleri dağılımı yönünden bakıldığında; MTHFR C677T, MTHFR A1298C, AHCY-1 5'UTR -34 C→T ve AHCY-2 Ekson 2 Arg38Trp 112 C→T için bir anlamlı fark bulunamamıştır (sırasıyla $p=0.175$, $p=0.582$, $p=0.458$ ve $p=0.458$). AHCY-4 Ekson 4 Try143Cys A→G

Çizelge 4.1 Hastaların özellikleri

Ölçüt	Anemi Grubu (n=52)	Anemi Gelişmeyen Grup (n=33)	P
Yaş	53.01±8.21	48.51±8.15	0.016
Cinsiyet (K/E)	33/19	22/11	0.737
Vücut Kitle İndeksi	27.03±4.08	26.13±3.37	0.316
Hemoglobin (gr/dl)	13.70±1.36	13.18±1.82	0.135
Platelet (/mm³)	192115±62223	195303±79336	0.837
ALT (IU)	82.30±93.57	76,48±72.61	0.762
AST (IU)	66.15±71.78	62.66±46.25	0.805
GGT (IU)	60.68±68.11	48.69±42.75	0.362
LDH (IU)	309.59±80.57	319.45±81.75	0.586
Hemoglobin düşüş zamanı (hafta)	11.84±9.13	6.42±3.25	0.002
En düşük hemoglobin değeri (gr/dl)	10.31±1.59	12.06±1.36	0.0001
Delta hemoglobin	3.40±1.03	1.12±0.80	0.0001
Doz azaltma (n,%)	28, % 55.76	3, % 9.09	0.001
İlaç kesme (n,%)	9, % 17.30	0, % 0	0.019

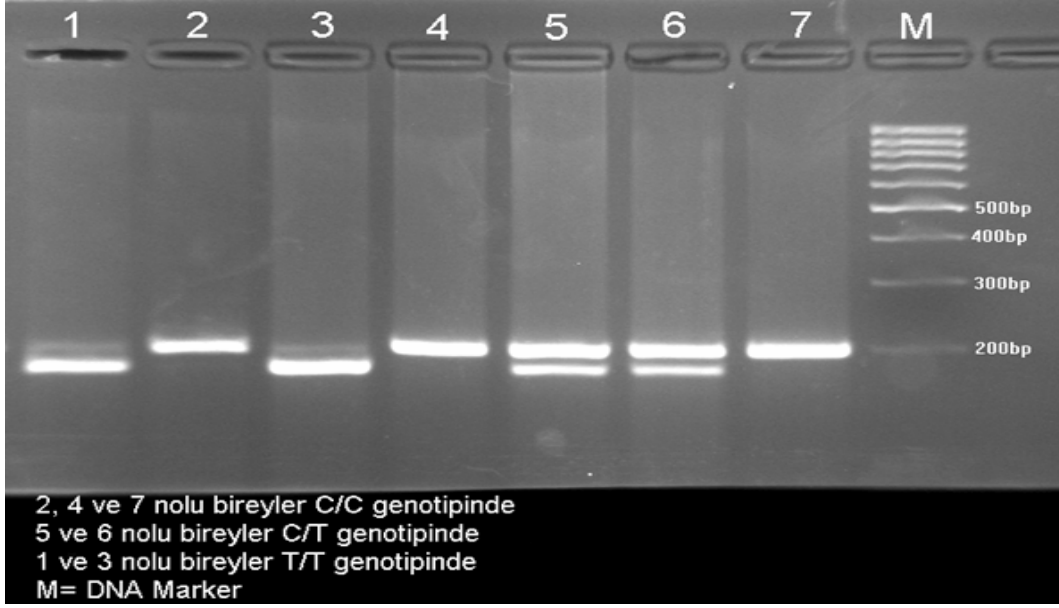
varyasyonunun dağılımı cinsiyetler arasında sabit olduğundan istatistiki değerlendirme yapılmamıştır.

43 hastada klasik interferon ve ribavirin kullanılırken 42 hastada peglenmiş interferon ve ribavirin kullanılmıştır. 43 klasik interferon ve ribavirin kullanan bireyin 27'sinde (%51.9) anemi gelişirken; peglenmiş interferon ve ribavirin kullanan 42 bireyin 25'inde (%48.1) anemi gelişmiştir. Tedavi yöntemleri arasında anemi sıklığı açısından anlamlı bir fark yoktur ($p=0.543$).

9.74 ± 7.86 haftada ortalama 2.51 ± 1.46 gr/dl düşüşle en düşük hemoglobin değeri olan 10.99 ± 1.72 gr/dl'ye ulaşıyordu. En düşük hemoglobin değerine anemi gelişen grupta ortalama 11.84 ± 9.13 haftada ulaşılırken, anemi gelişmeyen grupta 6.42 ± 3.25 haftada ulaşıyordu ($p=0.002$). Anemi olmayan grupta Hb en fazla 12.06 ± 1.36 ya düşerken, anemi olan grupta en fazla 10.31 ± 1.59 gr/dl'ye düşüyordu ($P=0.0001$). Delta Hb ise anemi olmayan grupta 1.12 ± 0.80 gr/dl iken anemi olan grupta 3.40 ± 1.03 gr/dl olarak elde edilmiş ve bu farkın istatistik olarak anlamlı olduğu, bir başka ifadeyle anemi olanlarda delta Hb'in daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0.0001$).

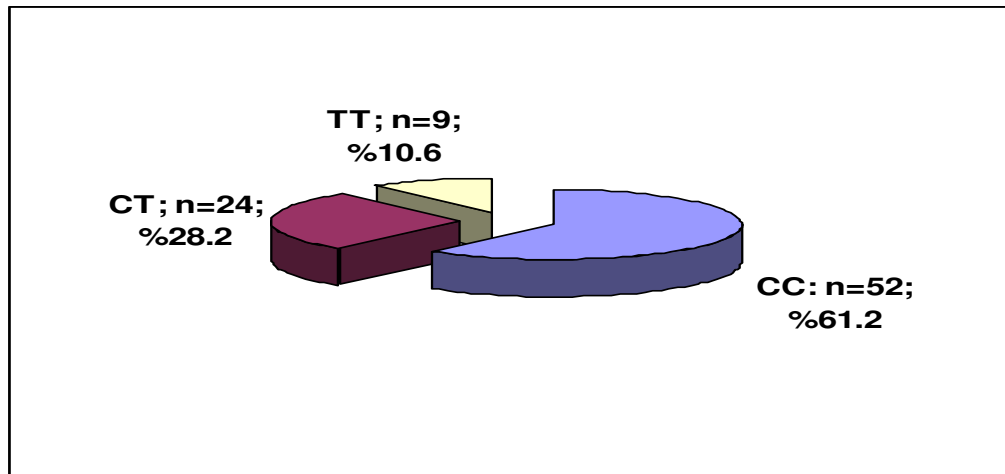
4.1. MTHFR C677T Gen Polimorfizmi Genotipleri ve Alelleri Dağılımı

MTHFR C677T gen polimorfizmini belirlemek için; elektroforez sonucu elde edilen bantların, görüntüleme sisteminde marker ile kıyaslaması yapıldı. RFLP analizi yapılmadan elde edilen PCR ürününün boyu 198 bp olarak belirlendi. RFLP analizinden sonra ise, 198 bp hizasında olan örnekler alel C, 175 bp ve 23 bp hizasında olan örnekler alel T olarak değerlendirildi. Fakat yapılan jel elektroforez yönteminden dolayı 23 bp'lik bant gözlenemedi. 198 bp hizasında olan örnek C/C genotipi, 175 bp hizasında olan örnek T/T genotipi, 198 bp ve 175 bp hizasında olan örnek ise C/T genotipi olarak değerlendirildi. Şekil 4.1'de RFLP analizi sonucu belirlenen 7 örnek gösterilmiştir. Şekil 4.1'de görülen örneklerle bakılırsa; 2, 4, 7 nolu örneklerle ait bantlar bireylerin C/C genotipinde; 5 ve 6 nolu örneklerdeki bantlar bireylerin C/T genotipinde; 1 ve 3 nolu örnekte görülen bant ise, bireyin T/T genotipinde olduğunu göstermektedir.

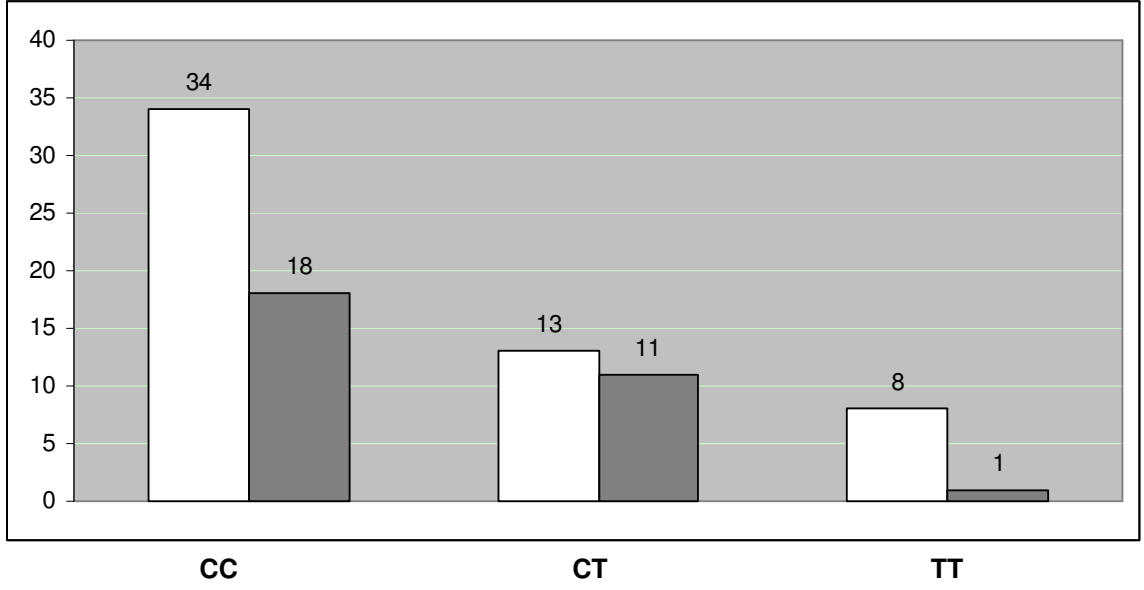


Şekil 4.1. MTHFR 677 C/T genotiplerinin RFLP sonucu elektroforez görüntüsü.

Gruplar MTHFR C677T polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde; 85 bireyin 52'si C/C genotipi (% 61.2), 24'ü C/T genotipi (% 28.2), ve 9'u T/T genotipi (% 10.6) tespit edildi (şekil 4.2). Bunların cinsiyete göre dağılımları incelendiğinde bayan bireylerde 34'ü C/C genotipi (% 61.8), 13 'ü C/T genotipi (% 23.6), 8'i T/Tgenotipi (% 14.5) tespit edildi. ve 30 erkek bireyden 18'inde C/C genotipi (%60.0), 11'inde C/T genotipi (% 36.7), 1'i T/T genotipi (% 3.3) tespit edildi (şekil 4.3). Cinsiyetlere göre dağılım açısından fark yoktu ($p=0.175$).

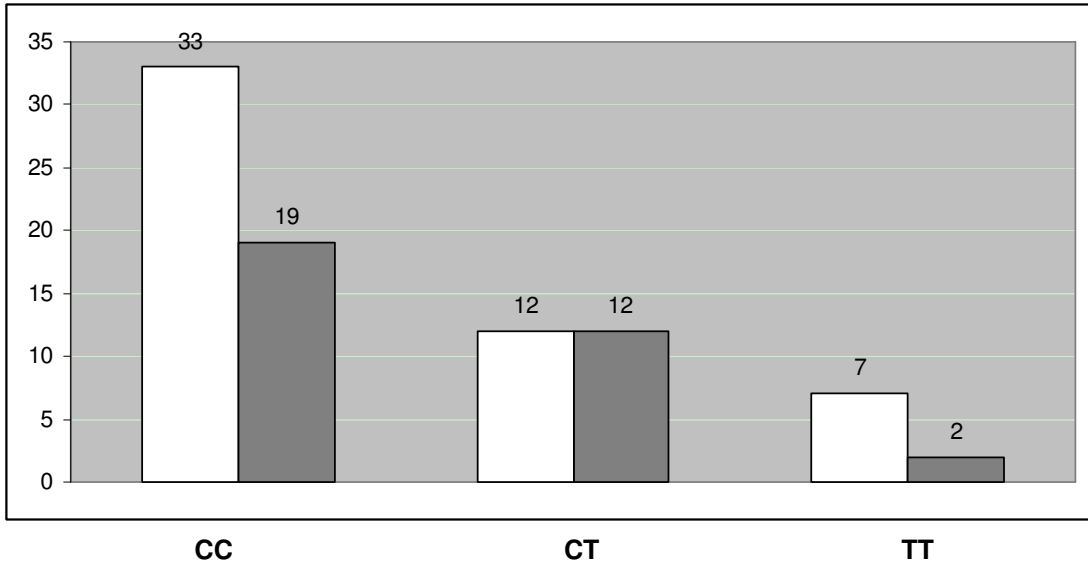


Şekil 4.2. MTHFR 677 C/T genotiplerinin dağılımı



Şekil 4.3. MTHFR 677 C/T genotiplerinin cinsiyetlere göre dağılımı (Beyaz sütunlar kadınları, gri sütunlar erkekleri göstermektedir).

Gruplar MTHFR C677T polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde; anemi gelişen 52 bireyin 33'ü C/C genotipinde (%63.5), 12'i C/T genotipinde (%23.1), 7'i T/T genotipinde (%13.5) bulunurken anemi gelişmeyen grupta (n=33) sırasıyla 19 (%57.6), 12 (%36.4) ve 2 (%6.1) bulundu (şekil 4.4).



Şekil 4.4. MTHFR 677 C/T genotiplerinin gruplara göre dağılımı (Beyaz sütunlar anemi gelişen grubu, gri sütunlar anemi gelişmeyen grubu göstermektedir).

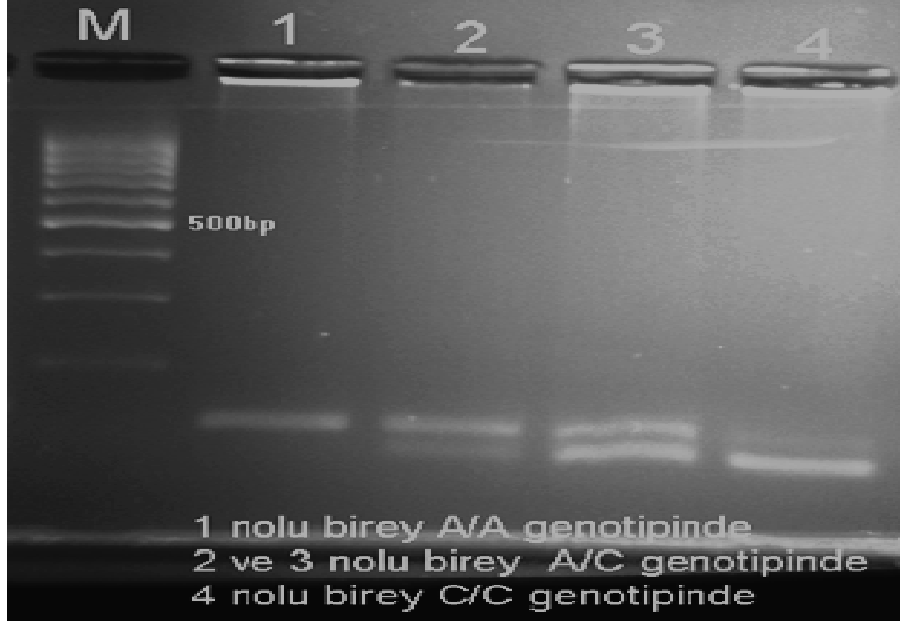
Ortalama hemoglobin düşüğü, MTHFR C677T polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde; genotipler arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.623$).

MTHFR C677T gen polimorfizmine ait T/T genotipinin anemi olanlarda C/C genotipine göre 6.029 kat daha fazla görüldüğü belirlendi ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.137$).

MTHFR C677T gen polimorfizmine ait genotiplerin anemi gelişen ve gelişmeyen grupta Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı araştırılmış ve anemi gelişmeyen grupta dengede bulunurken (ki-kare =0.20, SD=2), anemi grubunun Hardy-Weinberg dengesinden saptığı görülmüştür (ki-kare=7.5, SD=2, P=0.024). Sonuçlar incelendiğinde anemi grubunda C/C ve T/T genotiplerin beklenen sayıyla kıyaslandığında daha fazla olduğu, C/T genotiplilerin ise daha az görüldüğü bulunmuştur.

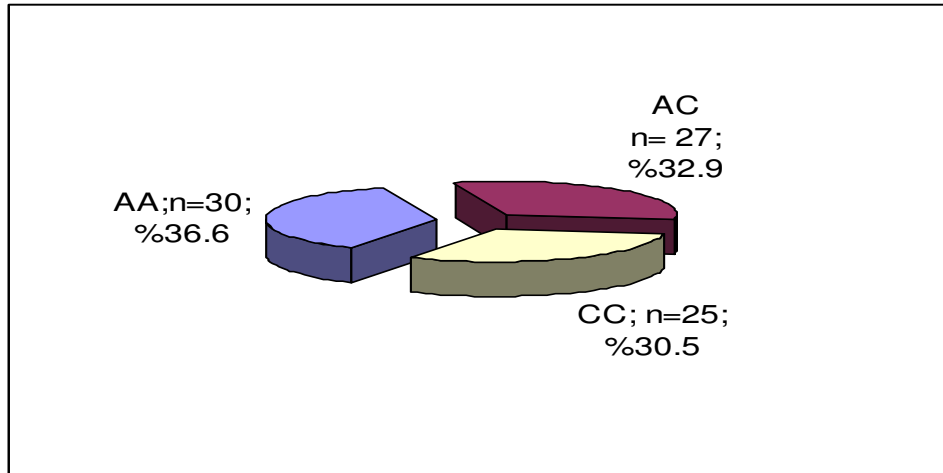
4.2. MTHFR A1298C Gen Polimorfizmi Genotipleri ve Alelleri Dağılımı

MTHFR A1298C gen polimorfizmini belirlemek için; elektroforez sonucu elde edilen bantların, görüntüleme sisteminde marker ile kıyaslaması yapıldı. RFLP analizi yapılmadan elde edilen PCR ürününün boyu 138 bp olarak belirlendi. RFLP analizinden sonra ise, 138 bp hizasında olan örnekler alel A, 119 bp ve 19 bp hizasında olan örnekler alel C olarak değerlendirildi. 19 bp'lik bant jel elektroforez yönteminden dolayı gözlenemedi. 138 bp hizasında olan örnek A/A genotipi, 138 ve 119 hizasında olan örnek A/C genotipi, 119 bp hizasında olan örnek ise C/C genotipi olarak değerlendirildi. Şekil 4.5'de RFLP analizi sonucu belirlenen 4 örnek gösterilmiştir. Şekil 4.5'de 1 nolu örneke ait bantlar bireyin A/A genotipinde; 2 ve 3 nolu örneklerdeki bantlar bireylerin A/C genotipinde ve 4 nolu örnekte görülen bant ise, bireyin C/C genotipinde olduğu göstermektedir.

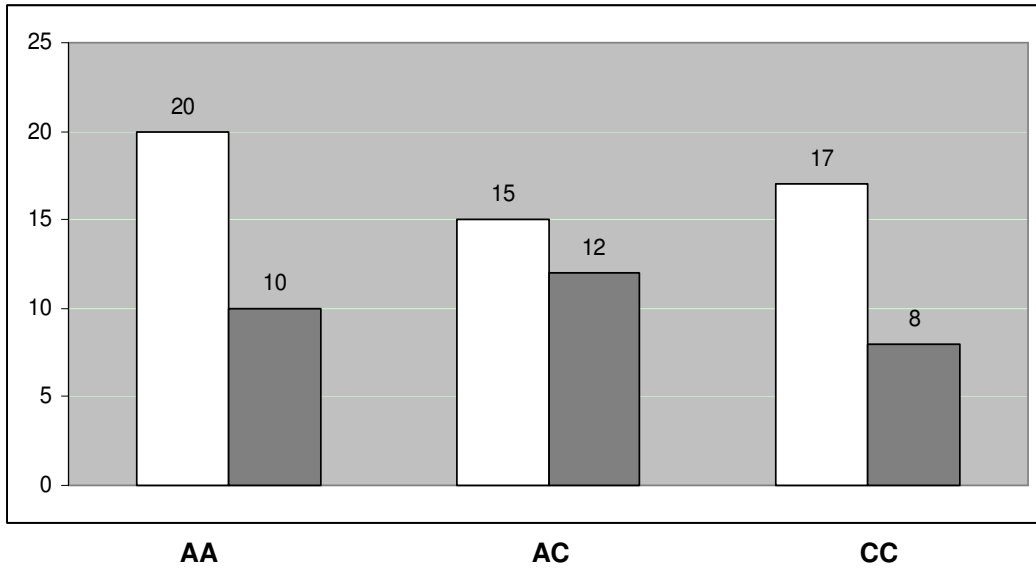


Şekil 4.5. MTHFR 1298 A/C genotiplerinin RFLP sonucu elektroforez görüntüsü.

Gruplar MTHFR A1298C polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde; 3 bireyde sonuç elde edilememiştir, 82 bireyin 30'u A/A genotipi (% 36.6), 27'i A/C genotipi (% 32.9), ve 25'i C/C genotipi (% 30.5) tespit edildi (şekil 4.6). Bunların cinsiyete göre dağılımları incelendiğinde 52 bayan bireyden 20'i A/A genotipi (% 38.5), 15'i A/C genotipi (% 28.8), 17'si C/C genotipi (% 32.7) tespit edildi ve 30 erkek bireyin 10'u A/A genotipi (%33.3), 12 A/C genotipi (% 40), 8'i C/C genotipi (% 26.7) tespit edildi (şekil 4.7). Cinsiyetlere göre dağılım açısından fark yoktu ($p=0.582$).

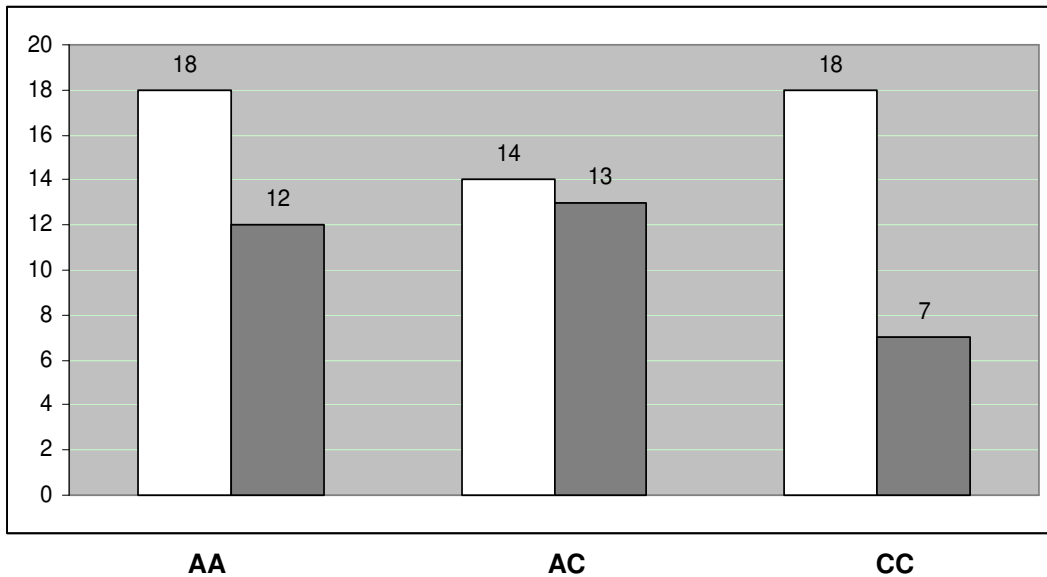


Şekil 4.6. MTHFR 1298 A/C genotiplerinin dağılımı



Şekil 4.7. MTHFR 1298 A/C genotiplerinin cinsiyetlere göre dağılımı (Beyaz sütunlar kadınları, gri sütunlar erkekleri göstermektedir).

Gruplar MTHFR A1298C polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde; anemi gelişen 50 bireyin 18'i A/A genotipinde (%36), 14'ü A/C genotipinde (%28), 18'i C/C genotipinde (%36) bulunurken anemi gelişmeyen grupta (n=12) sırasıyla 12 (%37.5), 13 (%40.6) ve 7 (%21.9) bulundu (şekil 4.8).



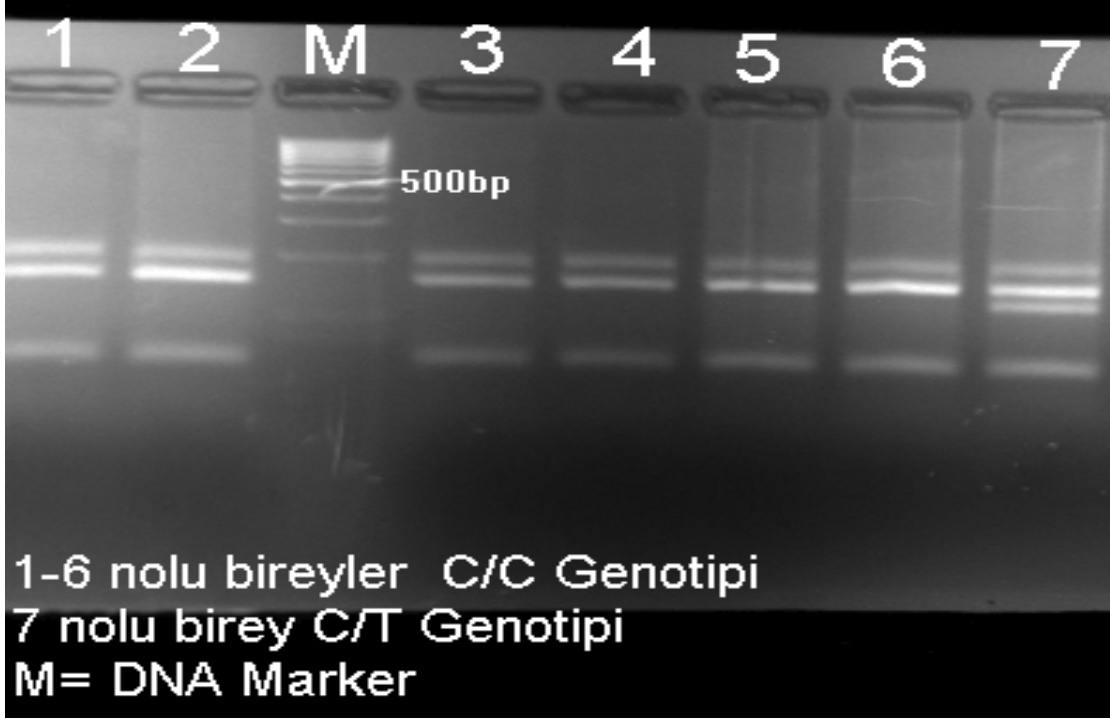
Şekil 4.8. MTHFR 1298 A/C genotiplerinin gruplara göre dağılımı (Beyaz sütunlar anemi gelişen grubu, gri sütunlar anemi gelişmeyen grubu göstermektedir).

Ortalama hemoglobin düşüŖü, MTHFR A1298C polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde; genotipler arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0.159$). MTHFR A1298C gen polimorfizmine ait C/C genotipinin anemi olanlarda A/A genotiplilere göre 3.586 kat fazla olmakla birlikte bu fazlalık istatistiksel olarak bulunmadı ($p=0.124$).

MTHFR A1298C gen polimorfizmine ait genotiplerin anemi geliŖen ve geliŖmeyen grupta Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı araŖtırılmıŖ ve anemi geliŖmeyen grupta dengede bulunurken (ki-kare =0.91, SD=2), anemi geliŖen grubun Hardy-Weinberg dengesinden saptığı grlmüŖtür (ki kare=7.68, SD=2, P=0.021). Sonuçlar incelendiğinde hastalarda A/A ve C/C genotiplerin beklenen sayıyla kıyaslandığında daha fazla olduğu, A/C genotiplilerin ise daha az görüldüğü bulundu.

4.3. AHCY-1 5'UTR -34 C→T Genotipleri ve Alelleri Dağılımı

AHCY-1 5'UTR -34 C→T (AHCY-1) gen dönüşümünü belirlemek için; elektroforez sonucu elde edilen bantların, görüntüleme sisteminde marker ile kıyaslaması yapıldı. RFLP analizi yapılmadan elde edilen PCR ürününün boyu 195 bp olarak belirlendi. RFLP analizinden sonra ise, 148 bp ve 47 bp hizasında olan örnekler alel C, 121 bp,47 bp ve 27 bp hizasında olan örnekler alel T olarak değerlendirildi.47 ve 27 bp'lik bantlar jel elektroforez yönteminden dolayđ izlenemedi. 148 bp hizasında olan rnek C/C genotipi; 121 bp hizasında olan rnek T/T genotipi; 148 bp, 121 bp, hizasında olan örnek ise C/T genotipi olarak değerlendirildi. Ŗekil 4.9'da RFLP analizi sonucu belirlenen 7 örnek gsterilmiŖtir; 1-6 nolu örneklere ait bantlar bireylerin C/C genotipi taŖıdıęını; 7 nolu örnekteki bantlar bireylerin C/T genotipinde olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9. AH CY-1 genotiplerinin RFLP sonucu elektroforez görüntüsü.

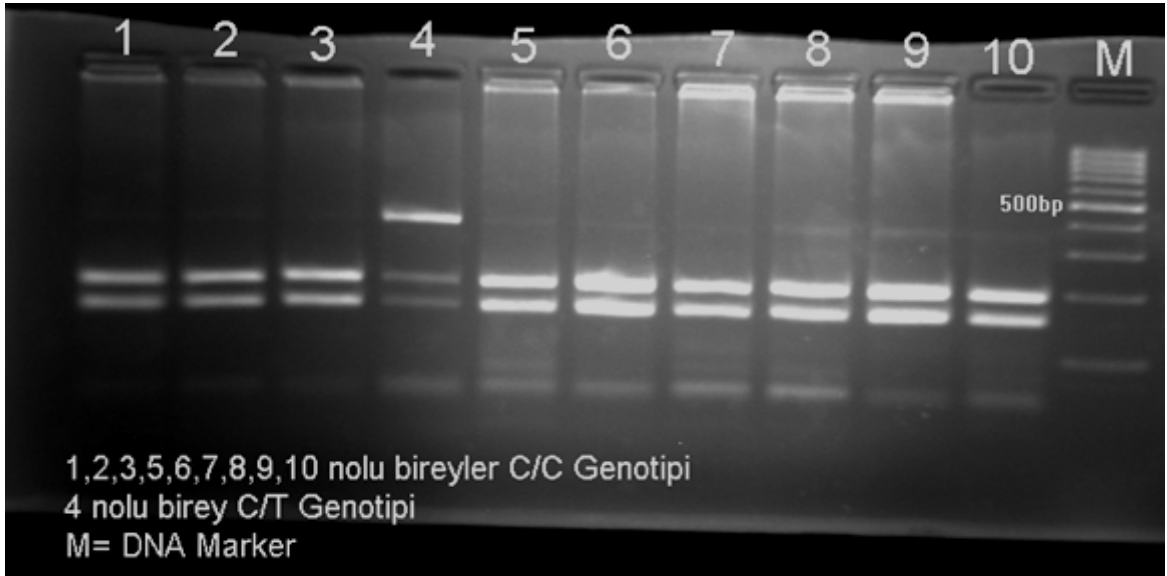
Gruplar AH CY-1 dönüşümü açısından değerlendirildiğinde; 85 bireyin 84'ü C/C genotipi (% 98.8), 1'i C/T genotipi (% 1.2), tespit edildi. T/T genotipine rastlanılmadı. Bunların cinsiyete göre dağılımları incelendiğinde 55 bayan bireyden 54'ü C/C genotipi (% 98.2), 1'i C/T genotipi (% 1.8), tespit edildi. 30 erkek bireyin 30'u C/C genotipi (% 100) tespit edildi. Cinsiyetlere göre dağılım açısından fark yoktu ($p=0.458$).

Gruplar AH CY-1 açısından değerlendirildiğinde; anemi gelişen 52 bireyin 52'si C/C genotipinde (%100), bulunurken anemi gelişmeyen grupta ($n=33$) sırasıyla 32 (%97), 1 (%3) bulundu.

Ortalama hemoglobin düşüşü yönünden, AH CY varyasyonların sıklığı çalışma grubumuzda çok az görüldüğü için (AH CY-1 1/85; AH CY-2 1/85 AH CY-4 0/84) istatistiki değerlendirilmeye alınmamıştır.

4.4. AHCY-2 Ekson 2 Arg38Trp 112 C→T Genotipleri ve Alelleri Dağılımı

AHCY-2 Ekson 2 Kodon Arg38Trp 112 C→T (AHCY-2) gen dönüşümünü belirlemek için; elektroforez sonucu elde edilen bantların, görüntüleme sisteminde marker ile kıyaslaması yapıldı. RFLP analizi yapılmadan elde edilen PCR ürününün boyu 338 bp olarak belirlendi. RFLP analizinden sonra ise, C aleli 189 bp ve 149 bp, T aleli 338 bp olarak değerlendirildi. 189 bp ve 149 bp hizasında olan örnek C/C genotipi; 338 bp T/T genotipi; 338 bp 189 bp ve 149 bp hizasında olan örnek ise C/T genotipi olarak değerlendirildi. Şekil 4.10'da RFLP analizi sonucu belirlenen 10 örnek gösterilmiştir; 1-3, 5-10 nolu örneklerle ait bantlar bireylerin C/C genotipinde olduğunu; 4 nolu örnekteki bantlar bireylerin C/T genotipinde olduğunu göstermektedir.



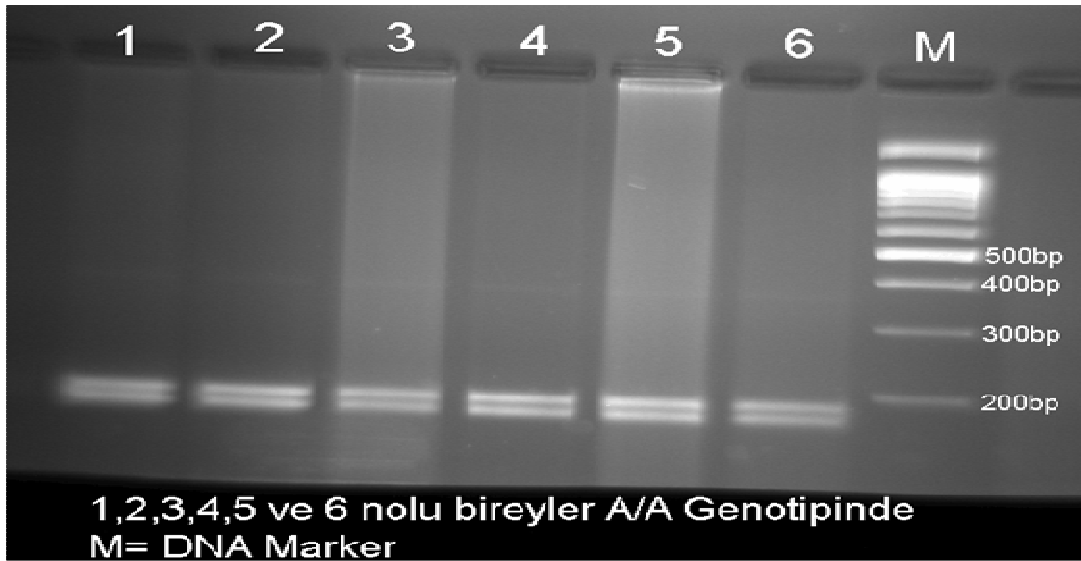
Şekil 4.10. AHCY-2 genotiplerinin RFLP sonucu elektroforez görüntüsü.

Gruplar AHCY-2 dönüşümü açısından değerlendirildiğinde; 85 bireyin 84'ü C/C genotipi (% 98.8), 1'i C/T genotipi (% 1.2), tespit edildi. T/T genotipine rastlanılmadı. Bunların cinsiyete göre dağılımları incelendiğinde 55 bayan bireyden 54'ü C/C genotipi (% 98.2), 1'i C/T genotipi (% 1.8), tespit edildi. 30 erkek bireyin 30'u C/C genotipi (% 100) tespit edildi. Cinsiyetlere göre dağılım açısından fark yoktu ($p=0.458$).

Gruplar AHCY-2 açısından değerlendirildiğinde; anemi gelişen 52 bireyin 52'i C/C genotipinde (%100), bulunurken anemi gelişmeyen grupta (n=33) sırasıyla 32 (%97), 1 (%3) bulundu.

4.5. AHCY-4 Ekson 4 Try143Cys A→G Genotipleri ve Alelleri Dağılımı

AHCY-4 Ekson 4 Kodon 143 Try38Cys A→G (AHCY-4) gen dönüşümünü belirlemek için; elektroforez sonucu elde edilen bantların, görüntüleme sisteminde marker ile kıyaslaması yapıldı. RFLP analizi yapılmadan elde edilen PCR ürününün boyu 350 bp olarak belirlendi. RFLP analizinden sonra ise, A aleli 179 bp ve 171 bp, G aleli 171 bp, 120 bp ve 59 bp olarak değerlendirildi. 59 bp'lik bant jel elektroforez yönteminden dolayı izlenemedi. 179 bp ve 171 bp hizasında olan örnek A/A genotipi; 171 bp ve 120 bp G/G genotipi; 179 bp, 171 bp, 120 bp hizasında olan örnek ise A/G genotipi olarak değerlendirildi. Şekil 4.11'de RFLP analizi sonucu belirlenen 6 örnek gösterilmiştir. Tüm örneklerle ait bantlar bireylerin A/A genotipinde olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.11. AHCY-4 genotiplerinin RFLP sonucu elektroforez görüntüsü.

Gruplar AHCY-4 dönüşümü açısından değerlendirildiğinde; 84 bireyin 84'ü A/A genotipi (% 100) tespit edildi. A/G ve G/G genotipine rastlanılmadı. Bu nedenle istatistiki değerlendirilmeye alınmamıştır.

TARTIŞMA

Yaptığımız bu çalışma MTHFR için C677T ve A1298C polimorfizmlerinin ve AH CY için AH CY-1 5'UTR -34 C→T, AH CY-2 112 C→T, AH CY-4 143 A→G varyasyonlarının ribavirinle ilişkili anemi için bir risk faktörü olmadığını göstermiştir. MTHFR C677T gen polimorfizmine ait T/T genotipinin anemi olanlarda C/C genotipine göre 6.029 kat daha fazla görüldüğü belirlendi ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0.137). MTHFR A1298C gen polimorfizmine ait C/C genotipinin anemi olanlarda A/A genotiplilere göre 3.586 kat fazla olmakla birlikte bu fazlalık istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.124).

İFN/ribavirin tedavisinin, HCV enfeksiyonlu hastalar için tekli tedaviden daha etkili olduğu kanıtlanmıştır ve hemolitik anemi, ribavirinle tedavinin önemli bir yan etkisidir. İFN/ribavirin tedavisiyle ilişkili hematolojik anormallikler arasında anemi, muhtemelen en önemli olanıdır ve hastaların sağlıkla ilişkili yaşam kalitesini azaltabildiği gibi, yorgunluğun ana belirleyici faktörü olabilir (135). Nonpegylated interferonla pegylated interferonun (Peginterferon) kıyaslandığı üç büyük çalışmanın verilerinin toplu bir analizinde, yorgunluk skorunun kötüleşmesi, tedavinin kesilmesine neden olan aneminin en önemli göstergesi olduğu saptanmıştır (136). Antiviral tedavinin zamansız azaltılması ve kesilmesi antiviral tedavinin etkililiğini azaltır. HCV enfeksiyonu için İFN/ribavirin ikili tedavisinin çok merkezli klinik çalışmalarında, anemi için doz azaltımı hastaların %23'ünde ortaya çıkmıştır (52,98). Doz kesilmesi, bu çalışmalarda nadir, ama doz kesilmesi oranı, klinik çalışmaların dışında daha yüksek bulunmuştur. Gaeta ve ark. (137) yaptıkları bir çalışmada, aneminin İFN/ribavirin tedavisinde zamansız ilaç kesilmesinin önde gelen nedeni olduğu, bütün ilaç kesme nedenlerinin %36'sından sorumlu olduğu ve bütün hastaların %8.8'inde anemi nedeniyle erkenden ilaç kesildiği gösterilmiştir. Anlamlı anemi (hemoglobin<10 g/dL), İFN/ribavirin tedavisini alan hastaların %9-13'ünde gözlenmiştir (98). Orta anemi (hemoglobin<11 g/dL), %30'unda görülmüştür (138). Hemoglobinde ortalama azami azalma ribavirinle birlikte nonpegylated interferonla 3.1 g/dL ve ribavirin ve pegylated interferonla 3.7 g/dL olarak saptanmıştır (52,139). Ribavirin, neredeyse bütün hastalarda

değişik derecelerde eritrosit hemolizisine sebep olur ve ikili tedavi alan hastaların %7-9'unda doz azaltılmasını gerektirir (2,3,52,98,137).

Bizim çalışmamızda anemi sıklığını 52/85 (% 61.17) olarak saptadık. Bu oranın literatürdekine göre yüksek olması anemi için hemoglobinde ≥ 2 gr/dl düşmeyi kabul etmemizden kaynaklanabilir. Ribavirin dozu 31 (% 36.47) hastada azatılırken 9 (% 10.58) hastada ribavirin kesildi ve bu sonuç literatürle benzerdi. Tedavi başladıktan sonraki 10 hafta içinde hemoglobin ortalama 2.5 gr/dl'lik bir azalmayla en düşük değeri olan ~11 gr/dl'ye ulaşıyordu.

Ribavirin sürekli kullanıldığında 2-4 hafta içinde kararlı düzeyine ulaşır (140). Hemotokrit değerleri genellikle, tedaviye başladıktan sonraki 2-8 haftanın içinde en düşük değerlerine ulaşır, bu zaman ribavirinin en yüksek konsantrasyona ulaştığı zamandır ve daha sonra hematokrit değerleri düz çizer, tedavi kesildikten sonra başlangıç değerlerine geri döner (141,142)

HCV enfeksiyonunun tedavisi için İFN/ribavirin ikili tedavisi sırasında gelişen aneminin mekanizması hakkında çok az bilgi vardır. Ribavirin, doz bağımlı ve geri çevrilebilir hemolitik anemiye sebep olur. Ribavirin eritrositlere girdikten sonra, adenozin trifosfatın tükenmesine yol açan aktif formuna fosforillenir ve hücrelerin işlevleriyle etkileşen ribavirin trifosfat eritrositlerde birikir (86,112). Ribavirin trifosfatın eritrositlerde birikmesi eritrosit membranında antioksidan mekanizmalarını bozarak eritrosit membranında oksidatif hasara yol açar ve takiben retiküloendotelial sistem ile hasarlı eritrositler uzaklaştırılır (112). İnterferonun, ribavirinle ilişkili hemolitik anemiye kompensatuvar retikülosit yanıtını bozduğunu ve interferonun kemik iliği baskılayıcı etkisinin, ikili tedaviyle ilişkili anemiye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (3,111).

Eritrositler in-vitro ribavirine maruz kaldığında eritrositlerin ne ozmotik frajilitesi ne de deformabilitesi değişmektedir (143). Ribavirin yüksek dozlarda kemik iliğinden eritrosit salınımını inhibe eder; ribavirin eritrosit yaşam süresini kısaltır (30-69 gün), ayrıca eritrosit kitlesini azaltır (143, 144).

HCV enfeksiyonu için tedavi edilen hastalarda hemolitik anemiye etkileyen değişkenler hakkında çok az bilgi vardır, ama 244 kronik HCV'li hastayı kapsayan yeni bir çalışma, ribavirin ile ilişkili hemolizin, üç faktör tarafından önemli şekilde etkilendiğini göstermiştir: tedavi öncesi platelet düzeyi, uygulanan interferon alfanın

miktarı ve haptoglobin fenotipi (113). Hemoglobin'e bağlanan haptoglobinlerin, farklı bağlanma bölgelerine sahip olan üç fenotipi mevcuttur. Van Vlierbergh ve ark.(113) yaptıkları çalışmada, hastaların %67'sinde anemi meydana geldiğini bulmuştur. Daha yüksek platelet sayıları olanlara göre daha düşük platelet sayılarıyla tedaviye başlayan hastaların, tedaviyle hemoglobin değerlerinde anlamlı düzeyde yüksek bir düşüş olduğunu tespit etmişlerdir (113). Düşük platelet sayısının ribavirinle ilişkili anemi için bir risk faktörü olduğu ve sirozlu yaşlı erkek hastalarda özellikle daha sık rastlandığı bulunmuştur (113). Kemikiliği baskılayıcı özelliği olduğu bilinen interferon alfa, yüksek dozlarda verildiği zaman, bu hastalarda anemiye katkıda bulunmaktadır (145). Anemiye etkileyen üçüncü faktör haptoglobin fenotipi için olası bir açıklama olarak, haptoglobin fenotipleri arasında ribavirinin hücre içine alınmasında veya yarışmalı hücre içine alınmasında farklar olabileceğini ileri sürülmüştür (112). Nomura ve ark. (146) yaptığı çalışmada kadın cinsiyeti, ileri yaş (> 60 yaş) ve kiloya ayarlı ribavirin dozu (>12 mg/kg) ile anemi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda sadece yaşın anemi gelişimi açısından bir risk oluşturduğu belirlendi. Yaş arttıkça anemi riski 1.112 kat artmaktaydı. Değerlendirilen 85 HCV'li bireyin 55'i bayan, 30'u erkekti. Kadınların yaş ortalaması erkeklere göre yüksekti. Her iki grupta ribavirin dozu azaltılan bireylerin büyük çoğunluğu kadındı. İlaç kesilen 9 hastanın 9'u da kadındı. Tüm bu bulgulara rağmen cinsiyet ile anemi gelişimi arasında bir ilişki saptayamadık.

İFN/ribavirin tedavisi sırasındaki hemoglobindeki azalma eritrosit ribavirin düzeyleriyle ilişkili olabilir. HCV eradikasyonu için İFN/ ribavirin tedavisi uygulanan hastalarda eritrosit ribavirin konsantrasyonu ve hematolojik ölçütlerdeki değişiklikler arasındaki ilişkinin araştırıldığı iki çalışmada, eritrosit içi ribavirinin ve onun fosforillenmiş metabolitinin aşırı yükselmesinin, interferon ve ribavirinle ilişkili anemiye yol açan hemoglobin azalmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (147,148).

Ayrıca in-vitro çalışmalarda HCV'nin tedavisi sırasında hemolitik anemi gelişen hastaların eritrositlerinin oksidatif strese daha yatkın olduğu gösterilmiştir (149). Ribavirinle ilişkili anemi öyküsü olan ve olmayan hastaların arasında oksidatif stres işaretleyicilerinde ve membran proteinlerinde bariz farklar bulunmuştur (149). Bu bulgular, ribavirinle ilişkili anemi için eritrositle ilgili risk faktörleri olduğunu akla getirmiştir. Eritrositlerinin oksidatif strese daha yatkın olmasının ve eritrosit membran

içeriğindeki değişikliklerin ribavirin tarafından AHCY'nin inhibisyonu sonucunda eritrosit içi AdoMet/AdoHcy oranındaki değişikliğe bağlı olabileceği ileri sürülmüşse de bu konuda bir çalışma yoktur (150). İFN/ribavirin tedavisinin serum lipid ve eritrosit membran lipid profilini etkileyebilir ve İFN/ribavirin tedavisinin neden olduğu anemiyle eritrosit membran lipidlerindeki değişiklikler arasında bir ilişki olabilir. İFN/ribavirin tedavisinin uygulandığı hastaların eritrosit membranı lipid içeriğinde, total kolesterol, total fosfolipidler ve kolesterol/fosfolipid oranı belirgin olarak artmış bulunmuştur (151). Fosfatidilkolin ve fosfatidilkolin/sfingomyelin oranı belirgin olarak artmışken diğer fosfolipid fraksiyonları belirgin olarak artmıştır (151). Bu bulgular interferon ve ribavirinle tedavi edilen kronik HCV'li hastaların serum lipid ve eritrosit membran lipid profilinde değişiklikler yaptığını göstermektedir (151). Özellikle, bu eritrosit membran lipidlerindeki değişiklikler ile eritrosit esnekliğinde ve membran akışkanlığında bir azalma olduğunu ve bu değişikliklerin İFN/ribavirin tedavisinin neden olduğu hemolitik anemiyle sonuçlanabileceğini ileri sürmektedir (151).

Vitamine bağlı tek karbon (metil grubu) metabolizmasındaki herhangi bir bozukluk kalp hastalıkları, nöral tüp bozukluğu ve kansere yakalanma riskini etkiler (29,117). 5-Metiltetrahidrofolat Hcy'nin metiyonine remetilasyonunda asıl metil vericisidir (29,117). MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, enzimde inaktivasyona neden olarak, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur (31,117,117). MTHFR enziminin eksikliği durumunda klinik semptomların geniş bir dağılım gösterdiği açıklanmıştır (26).

Bu bozukluklar iki gerekli moleküldeki eksikliklerden kaynaklanmaktadır (19-21,29,116,117). Bunlar folat ve kobalamin (B12 vitamini)'dir (18-21,29,116,117). Tek karbon mekanizması iki temel kola ayrılır; birisi pürin ve timin sentezinde rol oynar diğeri ise metiyonin, AdoMet sentezinde rol oynar (18-21,31,116,117). Protein ve poliamin sentezi ile metilasyon reaksiyonları için gerekli olan MTHFR enzimi bu iki kol arasındaki metil alış verişinde rol oynar (18-21,31,116,117). Metiyonin ve AdoMet'e tek karbon iç akımının MTHFR basamağında kontrol edildiği düşünülmektedir. İn-vitro memeli MTHFR'ı AdoMet tarafından baskılanır (18,31,117,118). MTHFR enzimi 5,10- metilenetetrahidrofolat (5,10-CH₂- THF) molekülünü 5-metil-THF molekülüne dönüştürür (18-21,31,116,117). 5-metil-THF

molekölü de kendisindeki metil grubunu Hcy'e verir ve metiyonin üretilir (18-21,31,116,117). Eğer bireyin mutasyonlardan dolayı MTHFR enzim aktivitesi düşükse, kan ve idrarda Hcy birikimi olur ve bu bireylerde "ciddi mental retardasyon" ve "tromboکلuziv vasküler" hastalıklar görüldüğü ileri sürülmüştür (25-27,29,117). MTHFR enziminin 2 tane düşük fonksiyonlu aleli vardır. Bunlar 667. nükleotitteki T aleli (MTHFR C677T) ve 1298. nükleotitteki C aleli (MTHFR A1298C) (29,117). 677T/T genotipine sahip insanların MTHFR aktivitesi %30, 677T/C genotipine sahip insanların MTHFR enzim aktivitesi %65 civarındadır (25,27,29,31,36,116-118). Toplumun yaklaşık %15'i homozigot 677T/T genotipine sahiptir (29,117). Bu T aleli yüksek seviyede Hcy ve düşük folat seviyesine sebep olur (25,29,117). Bu da damarsal hastalıkların ve nöral tüp defektlerin ortaya çıkma riskini arttırdığı gösterilmiştir (29,117).

MTHFR polimorfizmleri metilasyon gerektiren hedef yapıları modifiye edebilir. AdoMet'in metil sağladığı tüm reaksiyonların sonucunda oluşan AdoHcy, AHCY tarafından adenzin ve Hcy'e hidrolizlenir (101). AdoHcy'in hidrolizlenmesi geri dönüşümlü olduğu için, Hcy'in artmış düzeyleri AdoMet/AdoHcy hücre içi oranında azalmaya yol açarak birçok AdoMet bağımlı metiltransferazların aktivitelerini baskılar. AdoMet/AdoHcy oranı >4/1 normal düzeyinin altına düştüğünde, metiltransferazlar %10-60 arasında azalmalar ile değişen derecelerde azalmış aktivite gösterirler (102,126). MTHFR aktivasyonunun regülasyonu metiyonin ve AdoMet'in hücre içi konsantrasyonunun devam etmesi için önemlidir (152). MTHFR aktivitesi düşükse AdoMet/AdoHcy oranı da küçülür (152). AdoHcy, AdoMet'in MTHFR aktivitesindeki inhibitör etkisini baskılar fakat tek başına enzim aktivitesinde etkisi yoktur (153). Bu nedenle, memeli MTHFR'in aktivitesi hücre içi AdoMet/AdoHcy oranı tarafından ayarlanır (152).

Diğer yaygın polimorfizim olan MTHFR A1298C formu da, enzimin aktivitesini, Hcy ve plazma folat konsantrasyonunu etkiler, fakat etkisi C677T formundan daha düşüktür (153). MTHFR enziminin aktivitesinin sürdürülebilmesi için folat, metiyonin, ve riboflavinin hücre içi düzeylerinin önemli olduğu ve T/T homozigotların riboflavin ve folat düzeyi düşük olduğunda yüksek risk altında olabilecekleri ileri sürülmüştür (153).

MTHFR A1298C sıklığı C677T'den daha az çalışılmıştır ve A1298C homozigot sıklığı %9 olarak bulunmuştur (29,36). MTHFR C677T için homozigot sıklığı %1-%20 olarak bildirilmiştir (29). Bizim çalışmamızdaki 85 bireylik grupta MTHFR C677T için C/C genotipinin sıklığı %61.2, C/T genotipinin sıklığı %28.2 ve T/T genotipinin sıklığı %10.6 olarak bulunmuştur. MTHFR A1298C için A/C genotipinin sıklığı %36.6, A/C genotipinin sıklığı %32.9 ve C/C genotipinin sıklığı %30.5 olarak saptanmıştır. Bizim çalışma grubumuzda A1298C homozigot sıklığı literatürdekinden oldukça yüksektir. Bu yüksekliğin çalışılan grupta anlamı açık değildir.

Lievers KJ ve ark. (118) 2001 yılında Japonya'da yaptıkları bir çalışmada kardiyovasküler hastalıkların artışı ile C677T polimorfizmi arasında ilişki olduğunu bulmuşlardır. Diyabetik nefropati, diyabetes mellitusun yaygın bir durumudur. Tip 2 diyabetik nefropatili Japon hastalarla MTHFR C677T polimorfizmi arasındaki ilişki araştırılmış tip 2 diyabette C677T polimorfizminin myokardial infarkt riskini ve karotid arterial duvar kalınlaşmasını arttırdığı bulunmuştur (97). Fakat Japon tip 2, İrlanda tip 1, Alman tip1 ve tip 2 diyabetik hastalarında MTHFR gen polimorfizmi arasında ilişki bulunmamıştır (31). MTHFR A1298C ve C677T polimorfizmlerinin diyabetik nefropatiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir ve her iki polimorfizmin diyabetik popülasyonda yüksek olduğu bildirilmiştir (117). MTHFR C677T polimorfizmi ile birlikte oluşan folat eksikliğinin nöronal gelişimi etkilediği ve nöral tüp kusurunu arttırdığı bildirilmiştir (25,36).

MTHFR polimorfizminden kaynaklanan azalan enzim aktivitesi tümör baskılayıcı genlerin stabilitesini ve hipometilasyonunu etkileyebilir. Akciğer kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda MTHFR 677T alelinin bir tümör baskılayıcı gen olan p16'nın sunumunun artışıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (31). 677T alelinin akciğer kanseri, lösemi ve kolon kanserine karşı koruyucu bir potansiyeli olduğu açıklanmasına rağmen endometriyum ve over kanseri gibi diğer kanser tipleri için geçerli olmadığı açıklanmıştır (23,28,31,35)

Gellekink ve ark. (32) tekrarlayıcı venöz trombozlu 172 hastada AHICY-1 -34 C→T ve AHICY-2 112 C→T gen varyasyonlarına bakmışlardır. AHICY-1'de C/C sıklığını % 96.5, C/T sıklığını % 3.5 olarak bulmuşlardır ve T/T genotipine rastlamamışlardır (32). AHICY-2'de C/C sıklığını % 94.2, C/T sıklığını % 5.8 olarak bulmuşlardır ve T/T genotipine rastlamamışlardır (32). Bu gen varyasyonlarının

tekrarlayıcı venöz trombozda düşük dereceli bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir (32).

Bizim çalışmamızda hem AHCY-1 5'UTR -34 C→T gen varyasyonu için hem de AHCY-2 112 C→T gen varyasyonu için C/C sıklığı %98.8, C/T sıklığı %1.2 bulundu ve T/T'ye hiç rastlanmadı. AHCY-4 143G aleline de hiç rastlanmadı.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuçta hem MTHFR hem de AHCY metiyonin metabolizmasında ve hipometilasyonda önemli rolleri olmasına rağmen bu enzimlerin aktivitesinde değişikliğe yol açabilecek genetik kusurların ribavirine bağlı anemide etkili olup olmadığının araştırıldığı bu ilk çalışmada böyle bir ilişkiyi gösteremedik. Ancak anemi gelişimi için bir risk oluşturmamasına rağmen anemi olanlarda MTHFR C677T gen polimorfizmine ait T/T genotipi ~6 kat ve MTHFR A1298C gen polimorfizmine ait C/C genotipi ~3.5 kat daha fazla bulundu. Bakılan bu gen polimorfizmlerinin ribavirine bağlı anemide bir etkileri olmadığını söyleyebilmek için daha fazla çalışmaya gerek vardır. Yaşla birlikte ribavirinle ilişkili anemi riski arttığı için bu gruba tedavi verilirken daha dikkatli olunmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1- **Cameron CE, Castro C.** The mechanism of action of ribavirin: lethal mutagenesis of RNA virus genomes mediated by the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Curr Opin Infect Dis*, **2001**;14:757-64.
- 2- **Poynard T, Marcellin P, Lee S, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J.** Randomised trial of interferon-a-2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon-a-2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT) *Lancet*, **1998**;352:1426-1432.
- 3- **McHutchison J, Gordon S, Schiff E, Shiffman M, Lee W, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK.** Interferon a-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *New Engl J Med*, **1998**;339:1485-1492.
- 4- **Saab S, Martin P.** Hemolytic anemia and the treatment of chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol*, **1999**;28(4):289-290.
- 5- **Tappero G, Ballare M, Farina M, Negro F.** Severe anemia following combined alpha-interferon/ribavirin therapy of chronic hepatitis C (letter). *J Hepatol*, **1998**;29(6):1033-1034.
- 6- **Di Bisceglie AM, Shindo M, Fong TL, Fried MW, Swain MG, Bergasa NV, Axiotis CA, Waggoner JG, Park Y, Hoofnagle JH.** A pilot study of ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology*, **1992**;16(3):649-654.
- 7- **Main J.** Future studies of combination therapy for chronic hepatitis C: optimizing response rates for each hepatitis C population. *J Hepatol*, **1995**;23(Suppl 2):32-35.
- 8- **Reichard O, Schvarcz R, Weiland O.** Therapy of hepatitis C: alpha interferon and ribavirin. *Hepatology*, **1997**;26(3 Suppl 1):108S-111S.
- 9- **Sparrelid E, Ljungman P, Ekelof-Andstrom E, Aschan J, Ringden O, Winiarski J, Wahlin B, Andersson J.** Ribavirin therapy in bone marrow transplant recipients with viral respiratory tract infections. *Bone Marrow Transplant*, **1997**;19(9):905-908.
- 10- **Shulman NR.** Assessment of hematological effects of ribavirin in humans. In: Smith RA, Knight V, Smith JAD (eds.) New York. *Clinical Applications of Ribavirin*, Academic Press, **1984**; 79-92.
- 11- **Glue P.** The clinical pharmacology of ribavirin. *Semin Liver Dis*, **1999**;19:17-24.
- 12- **Bizollon T, Palazzo U, Ducerf C, Chevallier M, Elliott M, Baulieux J, Pouyet M, Trepo C.** Pilot study of the combination of interferon alfa and ribavirin as therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology*, **1997**; 26:500-504.

- 13- **Laskin OL, Longstreth JA, Hart CC, Scavuzzo D, Kalman CM, Connor JD, Roberts RB.** Ribavirin disposition in high-risk patients for acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1987**;41:546-555.
- 14- **Fabianowska-Majewska K, Duley JA, Simmonds HA.** Effects of novel anti-viral adenosine analogues on the activity of S-adenosylhomocysteine hydrolase from human liver. *Biochem Pharmacol*, **1994**;48(5):897-903.
- 15- **Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi, K McCann PP.** S-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J*, **1996** 10: 471-480.
- 16- **De Cabo SF, Hazen MJ, Molero ML, Fernandez-Piqueras J.** S-adenosyl-L-homocysteine: a non-cytotoxic hypomethylating agent. *Experientia*, **1994**;50(7):658-9.
- 17- **Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG, Galletti P, Zappia V.** Mechanism of erythrocyte accumulation of methylation inhibitor S-adenosylhomocysteine in uremia. *Kidney Int*, **1995**;47(1):247-53.
- 18- **Rosenblatt DS.** Methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Invest Med*, **2001**;24:56-59.
- 19- **Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E, Koch HG.** Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet*, 2000;8:725-729.
- 20- **Bagley PJ, Jacob S.** A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**;95:13217-13220.
- 21- **Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, Kauwell GP, Quinlivan EP, Davis SR, Cuadras A, Hutson AD, Gregory JF 3rd.** Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr*, **2002**;132:24665-24709.
- 22- **Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R.** A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*, **1998**;64: 169-172.
- 23- **Kim YL.** Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: A paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev*, **2000**;58:205-217.
- 24- **Daly SF, Molloy AM, Mills JL, Lee YJ, Conley M, Kirke PN, Weir DG, Scott JM.** The influence of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on enzyme activity in placental tissue. *Brit J Obstet Gynaec*, **1999**;106:1214-1218.

- 25- **Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, Selhub J.** Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate-adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr*, **2000**;130: 2238-2242.
- 26- **Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R.** Gene structure of human mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*, **1998**;9:652-656.
- 27- **Rady PL, Tyring SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, Matalon RK.** Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): The incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet*, **1999**; 86:380-384.
- 28- **Rozen R.** Methylenetetrahydrofolate reductase in vascular disease, neural tube defects and colon cancer. <http://vh2.boehringer-ingenelheim.es:8000/productos/workshop-methionina/inglesa/cap6.htm> Erişim; 12.04.2006.
- 29- **Botto LD, Yang Q.** 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: *Am J Epidemiol*, **2000**; 151: 862-77.
- 30- **Tonetti C, Burtscher A, Bories D, Tulliez M, Zittoun J.** Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in four siblings: A clinical, biochemical, and molecular study of the family. *Am J Med Genet*, **2000**; 91:363-367.
- 31- **Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassman G.** Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol*, **2000**;13(1):20-33.
- 32- **Gellekink H, den Heijer M, Kluijtmans LA, Blom HJ.** Effect of genetic variation in the human S-adenosylhomocysteine hydrolase gene on total homocysteine concentrations and risk of recurrent venous thrombosis. *Eur J Hum Genet*, **2004**;12(11):942-8.
- 33- **Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S, Mendel M, Kidron M, Bar-On H.** Common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: Association with plasma total homocysteine and folate concentrations. *J Nutr*, **1999**;129:656-1661.
- 34- **Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, **1995**;10: 111-113.
- 35- **Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G.** Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1999**;96(22):12810-12815.
- 36- **van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ.** A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural-tube defects. *Am J Hum Genet*, **1998**;62:1044-1051.

- 37- **Etiz N, Türkoğlu S.** Viral hepatitlerin tanısında kullanılan testler ve standardizasyon. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. Eds. *Viral hepatit 2005*, 1. Baskı. İstanbul, Ohan Matbaası, **2005**: 128-150.
- 38- **Shuhart MC, Gretch DR.** *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Edition. Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds) **2003**; 1480-1494.
- 39- **Şentürk H.** Hepatit C. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi No: 28. 2002*; 79- 85.
- 40- **Aach RD, Szmuness W, Mosley JW, Hollinger FB, Kahn RA, Stevens CE, Edwards VM, Werch J.** Serum alanine aminotransferase of donors in relation to the risk of non-A, non-B hepatitis in recipients: the transfusion-transmitted viruses study. *N Engl J Med*, **1981**;304(17):989- 94.
- 41- **Seeff LB.** Natural history of hepatitis C. *Hepatology*. **1997**; Sep (3 Suppl 1):21S-28S.
- 42- **Jonas MM.** Challenges in the treatment of hepatitis C in children. *Clin Liver Dis*, **2001**;5(4):1063-71.
- 43- **Witkowski JT, Robins RK, Sidwell RW, Simon LN.** Design, synthesis and broad spectrum antiviral activity of 1-*b*-D-Ribofuranosyl-1, 2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides. *J Med Chem*, **1972**;15: 1150–1154.
- 44- **Sidwell RW, Huffman JH, Khare GP, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK.** Broad spectrum antiviral activity of Virazole: 1-*b*-D-ribofuranosyl-1, 2,4-triazole-3-carboxamide. *Science*, **1972**;177: 705–706.
- 45- **Allen LB.** Review of *in vivo* efficacy of ribavirin. In: Smith R. A. and Kirkpatrick W. (eds.), *Ribavirin: A Broad Spectrum Antiviral Agent*, London, Academic Press, **1980**: 43–58.
- 46- World Health Organization. Hepatitis C – global prevalence (update). *World Health Org Weekly Epidemio. Rec*, **2000**;75: 18–19.
- 47- **Hoofnagle JH.** Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, **2002**;36: S21-S29.
- 48- **Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH.** Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology*, **2002**; 36: 121-127.
- 49- **Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, Yurdaydin C, Swain M, Kleiner DE, Mahaney K, Hoofnagle JH.** Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*, **1995**;123: 897–903.

- 50- **Feld JJ, Hoofnagle JH.** Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, **2005**;436: 967–972.
- 51- National Institutes of Health. Consensus Statement on Management of Hepatitis C. *NIH Consensus State Sci Statements*, **2002**;19:1–46.
- 52- **Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL Jr, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J.** Peginterferon *a*-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, **2002**; 347: 975–982.
- 53- **Tan SL, Pause A, Shi Y, Sonenberg N.** Hepatitis C therapeutics: Current status and emerging strategies. *Nat Rev Drug Discov*, **2002**; 1: 867–881.
- 54- **De Francesco R, Migliaccio G.** Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature*, **2005**; 436: 953–960.
- 55- **Lau JY, Tam RC, Liang TJ, Hong Z.** Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology*, **2002**; 35: 1002–1009.
- 56- **Parker WB.** Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res*, **2005**;107: 165–171.
- 57- **Dixit NM, Layden-Almer JE, Layden TJ, Perelson AS.** Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature*, **2004**;432: 922–924.
- 58- **Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS.** Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon-*a* therapy. *Science*, **1998**;282: 103–107.
- 59- **Lau DT, Kleiner DE, Ghany MG, Park Y, Schmid P, Hoofnagle JH.** 10-Year follow-up after interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology*, **1998**;28: 1121–1127.
- 60- **Smith RA.** Mechanisms of action of ribavirin. In: Smith R. A. and Kirkpatrick W. (eds.), *Ribavirin: A Broad Spectrum Antiviral Agent*, London, Academic Press, **1980**: 99–118.
- 61- **Smith RA.** Background and mechanisms of action of ribavirin. In: Smith RA, Knight V and Smith JAD (eds.), *Clinical Applications of Ribavirin*, Florida, Academic Press, **1984**:1–18.

- 62- **Maag D, Castro C, Hong Z, Cameron CE.** Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem*, **2001**; **276**: 46094–46098.
- 63- **Sintchak MD, Nimmesgern E.** The structure of inosine 5 ϕ -monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology*, **2000**;47: 163–184.
- 64- **Balzarini J, Karlsson A, Wang L, Bohman C, Horska K, Votruba I, Fridland A, Van Aerschot A, Herdewijn P, De Clercq E.** EICAR (5-ethynyl-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide): a novel potent inhibitor of inosinate dehydrogenase activity and guanylate biosynthesis. *J Biol Chem*, **1993**;268: 24591–24598.
- 65- **Herrmann E, Lee JH, Marison G, Modi M, Zeuzem S.** Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology*, **2003**;37: 1351–1358.
- 66- **Tam RC, Pai B, Bard J, Lim C, Averett DR, Phan UT, Milovanovic T.** Ribavirin polarizes human T cell responses towards a type 1 cytokine profile. *J Hepatol*, **1999**;30: 376–382.
- 67- **Edell D, Brice E, Hale K, Edell D, Khoshoo V.** Reduced long term respiratory morbidity after treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis with ribavirin in previously healthy infants: a preliminary report. *Pediatric Pulmonol*, **1998**;25: 154–158.
- 68- **Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, Naoumov NV.** hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, **2000**;118: 346–355.
- 69- **Domingo E, Escarmis C, Sevilla N, Moya A, Elena SF, Quer J, Novella IS, Holland JJ.** Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J*, **1996**;10: 859–864.
- 70- **Eigen M, McCaskill J, Schuster P.** The molecular quasi-species. *Adv Chem Phys* **1989**;75: 149–263.
- 71- **Eigen M.** Error catastrophe and antiviral strategy. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002**;99: 13374–13376.
- 72- **Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE.** The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med*. **2000**; 6: 1375–1379.
- 73- **Crotty S, Cameron CE, Andino R.** RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2001**;98: 6895–6900.
- 74- **Vignuzzi M, Stone JK, Andino R.** Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res*, **2005**;107: 173–181.

- 75- **Lanford RE, Chavez D, Guerra B, Lau JY, Hong Z, Brasky KM, Beames B.** Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J Virol*, **2001**; 75: 8074–8081.
- 76- **Hong Z.** The role of ribavirin-induced mutagenesis in HCV therapy: a concept or a fact? *Hepatology*, **2003**; 38: 807–810.
- 77- **Perelson AS, Ribeiro RM.** Mutagenic effects of ribavirin in vivo. *J Hepatol*, **2005**; 43: 553–555.
- 78- **Young KC, Lindsay KL, Lee KJ, Liu WC, He JW, Milstein SL, Lai MM.** Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology*, **2003**;38: 869–878.
- 79- **Asahina Y, Izumi N, Enomoto N, Uchihara M, Kurosaki M, Onuki Y, Nishimura Y, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Kitamura T, Miyake S.** Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol*, **2005**;43: 623–629.
- 80- **Pawlotsky JM, Dahari H, Neumann AU, Hezode C, Germanidis G, Lonjon I, Castera L, Dhumeaux D.** Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, **2004**;126: 703–714.
- 81- **Lutchman GA, Danehower S, Park Y, Ward C, Liang J T, Hoofnagle JH.** Mutation rate of hepatitis C virus inpatients during ribavirin monotherapy. *Hepatology*, **2004**; 41:385A.
- 82- **Patil SD, Ngo LY, Glue P, Unadkat J D.** Intestinal absorption of ribavirin is preferentially mediated by the Na⁺-nucleoside purine (N1) transporter. *Pharm Res*, **1998**;15: 950–952.
- 83- **Khakoo S, Glue P, Grellier L, Wells B, Bell A, Dash C, Murray-Lyon I, Lypnyj D, Flannery B, Walters K, Dusheiko GM.** Ribavirin and interferon alfa-2b in chronic hepatitis C: assessment of possible pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions. *Br J Clin Pharmacol*, **1998**;46: 563–570.
- 84- **Catlin DH, Smith RA, Sameuls AI.** 14C-Ribavirin: distribution and pharmacokinetic studies in rats, baboons and man. In: Smith R. A. and Kirkpatrick W. (eds.), London. *Ribavirin: A Broad Spectrum Antiviral Agent*, Academic Press, **1980**; 83–98.
- 85- **Glue P, Schenker S, Gupta S, Clement RP, Zambas D, Salfi M.** The single dose pharmacokinetics of ribavirin in subjects with chronic liver disease. *Br J Clin Pharmacol*; **2000**; 49: 417–421.
- 86- **Jarvis SM, Thorn JA, Glue P.** Ribavirin uptake by human erythrocytes and the involvement of nitrobenzylthioinosine-sensitive (*es*)-nucleoside transporters. *Br J Clin Pharmacol*, **1998**;123: 1587–1592.

- 87- **Balzarini J, Lee CK, Herdewijn P, De Clercq E.** Mechanism of the potentiating effect of ribavirin on the activity of 2 ϵ ,3 ϵ -dideoxyinosine against human immunodeficiency virus. *J Biol Chem*, **1991**;266: 21509–21514.
- 88- **Gallois-Montbrun S, Chen Y, Dutartre H, Sophys M, Morera S, Guerreiro C, Schneider B, Mulard L, Janin J, Veron M, Deville-Bonne D, Canard B.** Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets. *Mol Pharmacol*, **2003**;63: 538–546.
- 89- **Zimmerman TP, Deeprouse RD.** Metabolism of 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5 ϵ -triphosphates in human blood and L5178Y cells. *Biochem Pharmacol*, **1978**;27: 709–716.
- 90- **Page T, Connor JD.** The metabolism of ribavirin in erythrocytes and nucleated cells. *Int J Biochem*, **1990**;22: 379–383.
- 91- **Dusheiko G, Main J, Thomas H, Reichard O, Lee C, Dhillon A, Rassam S, Fryden A, Reesink H, Bassendine M, Norkrans G, Cuypers T, Lelie N, Telfer P, Watson J, Weegink C, Sillikens P, Weiland O.** Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo-controlled study. *J Hepatol*, **1996**; 25: 591–598.
- 92- **Bodenheimer HC Jr, Lindsay KL, Davis GL, Lewis JH, Thung SN, Seeff L. B.** Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: A multicenter trial. *Hepatology*, **1997**;26: 473–477.
- 93- **Welling P. G.** Pharmacokinetics: Processes and Mathematics, American Chemical Society, Washington, DC. **1986**.
- 94- **Powers KA, Dixit NM, Ribeiro RM, Golia P, Talal AH, Perelson AS.** Modeling viral and drug kinetics: hepatitis C virus treatment with pegylated interferon α -2b. *Semin Liv Dis*, **2003**;23: 13–18.
- 95- **Zoulim F, Haem J, Ahmed SS, Chossegros P, Habersetzer F, Chevallier M, Bailly F, Trepo C.** Ribavirin monotherapy in patients with chronic hepatitis C: a retrospective study of 95 patients. *J Viral Hepat*, **1998**;5: 193–198.
- 96- **Ribeiro RM, Layden-Almer J, Powers KA, Layden TJ, Perelson AS.** Dynamics of alanine aminotransferase during hepatitis C virus treatment. *Hepatology*, **2003**; 38: 509–517.
- 97- **Dixit NM, Perelson AS.** The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus. *Cell Mol Life Sci*, **2006**; Feb 23:1-11.
- 98- **Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK.** Peginterferon α -2b plus ribavirin compared with interferon α -2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* **2001**; 358: 958-965.

- 99- **Hadziyannis SJ, Sette Jr H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer Jr H, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros P, Lin A, Ackrill AM.** Peginterferon alfa-2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. A randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Int Med*, **2004**; 140: 346-355.
- 100- **Fried MW.** Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology*, **2002**; 36: 237-244.
- 101- **McHutchison JG, Manns M, Patel K, Poynard T, Lindsay KL, Trepo C, Dienstag J, Lee WM, Mak C, Garaud JJ, Albrecht JK; International Hepatitis Interventional Therapy Group.** Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, **2002**; 123: 1061-1069.
- 102- **Soza A, Everhart JE, Ghany MG, Doo E, Heller T, Promrat K, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH.** Neutropenia during combination therapy of interferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *Hepatology*, **2002**; 36: 1273-1279.
- 103- **Maddrey WC.** Safety of combination interferon alfa-2b/ribavirin therapy in chronic hepatitis C-relapsed and treatment-naive patients. *Semin Liver Dis*, **1999**; 19(Suppl 1): 67-75.
- 104- **Shiffman ML, Hofmann CM, Sterling RK, Luketic VA, Contos MJ, Sanyal AJ.** A randomized, controlled trial to determine whether continued ribavirin monotherapy in hepatitis C virus-infected patients who responded to interferon-ribavirin combination therapy will enhance sustained virologic response. *J Infect Dis*, **2001**; 184: 405-409.
- 105- **Reed WW, Diehl LF.** Leukopenia, neutropenia and reduced hemoglobin levels in healthy American blacks. *Ann Intern Med*, **1991**; 151: 501-505.
- 106- **Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WG, Dusheiko GM, Lee SS, Balart L, Reindollar R, Reddy RK, Wright TL, Lin A, Hoffman J, De Pamphilis J.** Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med*, **2000**; 343: 1673-1680.
- 107- **Fukuda A, Kobayashi H, Teramura K, Yoshimoto S, Ohsawa N.** Effects of interferon alfa on peripheral neutrophil counts and serum granulocyte colony stimulating factor levels in chronic hepatitis C patients. *Cytokines Cell Mol Ther*, **2000**; 6: 149-154.
- 108- **Carreno V, Martin J, Pardo M, Brotons A, Anchia P, Navas S, Fernandez M, Arocena C, Quiroga JA.** Randomized controlled trial of recombinant human granulocyte macrophage stimulating factor for the treatment of chronic hepatitis C. *Cytokine*, **2000**; 12: 165-170.
- 109- **Crippin JS, McCashland T, Terrault N, Sheiner P, Charlton MR.** A pilot study of the tolerability and efficacy of antiviral therapy in hepatitis C virus-infected patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl*, **2002**; 8: 350-5.
- 110- **Fujii H, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Seki S, Hino M.** Life-threatening severe immune thrombocytopenia during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology*, **2003**; 50: 841-842.

- 111- **Peck-Radosavljevic M, Wichlas M, Homoncik-Kraml M, Kreil A, Hofer H, Jessner W, Gangl A, Ferenci P.** Rapid suppression of hematopoiesis by standard or pegylated interferon-alpha. *Gastroenterology*, **2002**; 123: 141-151.
- 112- **De Franceschi L, Fattovich G, Turrini F, Ayi K, Brugnara C, Manzato F, Noventa F, Stanzial AM, Solero P, Corrocher R.** Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage. *Hepatology*, **2000**; 31: 997-1004.
- 113- **van Vlierbergh H, Delanghe JR, De Vos M, Leroux-Roel G; BASL Steering Committee.** Factors influencing ribavirin-induced hemolysis. *J Hepatol*, **2001**;34: 911-916.
- 114- **Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J.** Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, **2003**; 38: 645-652.
- 115- **Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everson GT, Lok AS, Morgan TR, Bonkovsky HL, Lee WM, Dienstag JL, Ghany MG, Goodman ZD, Everhart JE, Hepatitis C Antiviral Long-Term Treatment Against Cirrhosis Trial Group.** Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. *Gastroenterology*, **2004**;126(4):1015-23.
- 116- **Fowler B.** Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Semin Vasc Med*. **2005**;5(2):77-86.
- 117- **Dikmen M.** Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enziminin Moleküler Biyolojisi ve Hastalıklarla İlişkisi. *The Medical Journal of Kocatepe*, **2004**;5: 9- 16.
- 118- **Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Kluijtmans LA, van der Put NM, Trijbels FJ, Blom HJ.** A second common variant in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine and cardiovascular disease risk. *J Mol Med*, **2001**;79(9):522-8.
- 119- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=607093> **OMIM** 607093. Erişim; 14.05.2006
- 120- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=87239999> **GenBank** M005957. Erişim; 14.05.2006
- 121- **Finkelstein JD.** Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*, **1990**;1:228–237
- 122- **Clarke S, Banfield K.** S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. In: Carmel R, Jacobsen D, eds. Homocysteine in Health and Disease Cambridge: Cambridge University Press; **2001**: 63–78.

- 123- **Hershfield MS, Aiyar VN, Premakumar R, Small WC.** Sadenosylhomocysteine hydrolase from human placenta. Affinity purification and characterisation. *Biochem J*, **1985**; 230:43–52.
- 124- **Coulter-Karis DE, Hershfield MS.** Sequence of full length cDNA for human S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Ann Hum Genet*, **1989**;53:169–175.
- 125- **Ault-Riche DB, Yuan CS, Borchardt RT.** A single mutation at lysine 426 of human placental S-adenosylhomocysteine hydrolase inactivates the enzyme. *J Biol Chem*, **1994**;269: 31472–31478.
- 126- **Cantoni GL, Richards HH, Chiang PK.** Inhibitors of Sadenosylhomocysteine hydrolase and their role in the regulation of biological methylation. In: Usdin E, Borchardt RT, Creveling CR, eds. Transmethylation. New York: Elsevier/North-Holland; **1979**:155–164.
- 127- **Mohandas T, Sparkes RS, Suh EJ, Hershfield MS.** Regional localization of the human genes for S-adenosylhomocysteine hydrolase (cen-q131) and adenosine deaminase (q131-qter) on chromosome 20. *Hum Genet*, **1984**;66: 292-295.
- 128- **Eiberg H, Mohr J.** Linkage data concerning the ADA-AHCY relationship. *Cytogenet Cell Genet*, **1985**;40: 622 (Abstract).
- 129- **Kloor D, Fumic K, Attig S, Tete M, Osswald H, Baric I, Tomiuk J, Kompf J.** Studies of S-adenosylhomocysteine-hydrolase polymorphism in a Croatian population. *J Hum Genet*, **2006**;51: 21-24.
- 130- **Labrune P, Perignon JL, Rault M, Brunet C, Lutun H, Charpentier C, Saudubray JM, Odievre M.** Familial hypermethioninemia partially responsive to dietary restriction. *J Pediatr*, **1990**;117: 220-226.
- 131- **Baric I, Fumic K, Glenn B, Cuk M, Schulze A, Finkelstein JD, James SJ, Mejaski-Bosnjak V, Pazanin L, Pogribny IP, Rados M, Sarnavka V, Scukanec-Spoljar M, Allen RH, Stabler S, Uzelac L, Vugrek O, Wagner C, Zeisel S, Mudd SH.** S-adenosyl homocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2004**;101: 4234–4239.
- 132- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=180960> **OMIM** +180960. Erişim; 14.05.2006.
- 133- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=178276> **GenBank** M61831. Erişim;14.05.2006.
- 134- **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracing DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, **1988**; 16:12-15.
- 135- **Martin LM, Younossi ZM, Price L.** The impact of ribavirin induced anemia on health-related quality of life. *Hepatology*, **2001**; 34(suppl):600A. (Abstract).

- 136- **Bernstein D, Kleinman L, Barker CM, Revicki DA, Green J.** Relationship of health-related quality of life to treatment adherence and sustained response in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*, **2002**; 35:704–708.
- 137- **Gaeta GB, Precone DF, Felaco FM, Bruno R, Spadaro A, Stornaiuolo G, Stanzione M, Ascione T, De Sena R, Campanone A, Filice G, Piccinino F.** Premature discontinuation of interferon plus ribavirin for adverse effects: a multicentre survey in ‘real world’ patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*, **2002**; 16:1633–1639.
- 138- PEG-Intron (peginterferon alfa-2b) package insert. Kenilworth, NJ: Schering Corporation; October **2003**.
- 139- **Maddrey WC.** Safety of combination interferon alfa-2b/ribavirin therapy in chronic hepatitis C-relapsed and treatment-naïve patients. *Semin Liver Dis*, **1999**;19:67–75.
- 140- **Lertora JJ, Rege AB, Lacour JT, Ferencz N, George WJ, VanDyke RB, Agrawal KC, Hyslop NE Jr.** Pharmacokinetics and long-term tolerance to ribavirin in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Pharmacol Ther*, **1991**;50(4):442-9.
- 141- **Jen JF, Glue P, Gupta S, Zambas D, Hajian G.** Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Ther Drug Monit*, **2000**;22(5):555-65.
- 142- **Tran TT, Martin P.** Chronic hepatitis C. *Curr Treat Options Gastroenterol*. **2001**;4:503-510.
- 143- **Canonico PG, Castello MD, Cosgriff TM, Donovan JC, Ross PE, Spears CT, Stephen EL.** Hematological and bone marrow effects of ribavirin in rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*, **1984**;74(2):163-72.
- 144- **Furne JK, Springfield JR, Ho SB, Levitt MD.** Simplification of the end-alveolar carbon monoxide technique to assess erythrocyte survival. *J Lab Clin Med*. **2003**;142(1):52-7.
- 145- **Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM, Waggoner JG, Park Y.** Interferon alfa for patients with clinically apparent cirrhosis due to chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. **1993**;104:1116-1121.
- 146- **Nomura H, Tanimoto H, Kajiwara E, Shimono J, Maruyama T, Yamashita N, Nagano M, Higashi M, Mukai T, Matsui Y, Hayashi J, Kashiwagi S, Ishibashi H.** Factors contributing to ribavirin-induced anemia. *J Gastroenterol Hepatol*. **2004**;19(11):1312-7.
- 147- **Homma M, Matsuzaki Y, Inoue Y, Shibata M, Mitamura K, Tanaka N, Kohda Y.** Marked elevation of erythrocyte ribavirin levels in interferon and ribavirin-induced anemia. *Clin Gastroenterol Hepatol*. **2004**;2(4):337-9.

- 148- **Inoue Y, Homma M, Matsuzaki Y, Shibata M, Matsumura T, Ito T, Kohda Y.** Erythrocyte ribavirin concentration for assessing hemoglobin reduction in interferon and ribavirin combination therapy. *Hepatol Res*, **2005**;34:23-27.
- 149- **Grattagliano I, Russmann S, Palmieri VO, Portincasa P, Palasciano G, Lauterburg BH.** Glutathione peroxidase, thioredoxin, and membrane protein changes in erythrocytes predict ribavirin-induced anemia. *Clin Pharmacol Ther*, **2005**;78(4):422-32.
- 150- **Altintas E, Sezgin O.** S-adenosylhomocysteine hydrolase, S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine: correlations with ribavirin induced anemia. *Med Hypotheses*, **2004**;63(5):834-7.
- 151- **Tanaka H, Miyano M, Ueda H, Fukui K, Ichinose M.** Changes in serum and red blood cell membrane lipids in patients treated with interferon ribavirin for chronic hepatitis C. *Clin Exp Med*, **2005**;5(4):190-5.
- 152- **Yamada K, Strahler JR, Andrews PC, Matthews RG.** Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**;102(30):10454-9.
- 153- **Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG.** Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2001**;98(26):14853-8.

ÖZGEÇMİŞ

AD-SOYAD : Zühal MERT ALTINTAŞ

ADRES : 75.Yıl Mahallesi GMK Bulvarı Palma 2 Sitesi B/2 Blok No:5 33320
Davultepe/MERSİN

TELEFON : Ev- 0324 4813063
Cep-0535 4693919

DOĞUM TARİHİ : 03.06.1970

DOĞUM YERİ : Ankara

EĞİTİM DURUMU :

1976-1979: Abdülvahit Sağlam İlkokulu, Ayvalık, BALIKESİR

1979-1981: Sakarya İlkokulu, Ayvalık, BALIKESİR

1981-1983: Ayvalık Lisesi, Ayvalık, BALIKESİR

1983-1987: Mustafa Kemal Lisesi, Yenimahalle, ANKARA

1987-1994: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

SERTİFİKALAR:

09-15 Kasım 1998: 1.Sağlık Projesi Uyum Eğitimi Sertifikası

15/09/2000: Hemodiyaliz Sorumlu Hekim Sertifikası (Sertifika no:317)

KONGRELER:

09-11/12/1998: Danışmanlık ve Gebe Takibi; Ankara

11-15/01/1999: Sağlam Çocuk Takibi ve Yaşlı Sağlığı, Bağışıklama; Ankara

03/03/1999: Mesleki Dermatolojiler; Ankara

13/04/1999: Mantar Hastalıkları; Ankara

22-24/04/1999: 2.Gastropratisyen Kursu, Ürgüp, Nevşehir

05/05/1999: Genel Sağlık Hizmetlerinde Depresyon, Ankara

05-07/04/2002: Hipertansiyon Tedavisinde Yenilikler-Roche Sempozyumları,

Gazi Mağusa, Kıbrıs

DENEYİMLER:

Ocak 1995-Ağustos 1996: Merkez Sağlık Ocağı, Taşköprü; Kastamonu

Ağustos 1996- Mayıs 1998: 1 Nolu AÇSAP, Karabük

Haziran 1998-Ekim 1999: 1 Nolu AÇSAP, Yenimahalle, ANKARA

Ekim 1999-Aralık 1999: Acil Müdahale, Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Ankara

Ocak 2000-Ekim 2001: Hemodiyaliz Ünitesi, Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Ankara

Mayıs 2001-Ekim 2001: Transplantasyon Koordinasyon Sorumlusu, Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Ankara

30 Ekim 2001- 03 Mart 2003 : Hemodiyaliz Ünitesi, Devlet Hastanesi, Mersin

03 Mart 2003 –Kasım 2004 : Hemodiyaliz Ünitesi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi

Kasım 2004- : Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Öğrencisi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü