



YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**SAĞLIKLI BİREYLERDEKİ KEMOKİN
RESEPTÖRLERİNDE MEYDANA GELEN GEN
POLİMORFİZMİ NEDENİ İLE OLUŞAN HIV
DİRENCİN SAPTANMASI**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ŞAHAP AKSAÇLI

İSTANBUL – 2019



YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**SAĞLIKLI BİREYLERDEKİ KEMOKİN
RESEPTÖRLERİNDE MEYDANA GELEN GEN
POLİMORFİZMİ NEDENİ İLE OLUŞAN HIV
DİRENCİN SAPTANMASI**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ŞAHAP AKSAÇLI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. GÜLDEN ÇELİK

İSTANBUL – 2019

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program : Moleküler Tıp Anabilim Dalı
Tez Başlığı :Sağlıklı Bireylerdeki Kemokin Reseptörlerinde Meydana Gelen Gen Polimorfizmi Nedeni ile Oluşan HIV Direncin Saptanması.
Tez Sahibi : Şahap Aksaçlı
Sınav Tarihi : 03.04.2019

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Jüri Başkanı:	Prof.Dr. Turgay İsbir Yeditepe Üniversitesi	
Tez danışmanı:	Prof.Dr. Gülden Çelik Doğu Akdeniz Üniversitesi	
Üye:	Prof.Dr. Arzu Ergen İstanbul Üniversitesi	

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 12.../04/2019 tarih ve 06-08 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof.Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

03.03.2019



Şahap AKSAÇLI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim başta olmak üzere, gerek meslek hayatım, gerek sosyal hayatım da çok değerli ve sevilen bir hoca olmanın yanında, her zaman bir yol gösterici, bir baba, hayattaki duruşu ile her zaman en değerli ve en güzel örnek olan çok değerli büyük hoca Sayın Prof.Dr.Turgay İSBİR' e

İlk tanıdığım günden bugüne çok özel bir namzet olan, doğru yoldan doğru bir şekilde gitmeyi öğreten, hiçbir insanı asla üzmeyen, ihtiyaç duyduğum her an çok değerli zamanından hiç düşünmeden ödün veren, engin bilgi birikimi ile kendisinden çok şey öğrendiğim, sabrını, okuma ve öğrenme hevesini hep örnek alacağım yol göstericim çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gülden ÇELİK'e

Öğrencilik yıllarımda tanıştığım günden bugüne beni sabırla eğiten, ihtiyaç duyduğum her an yardımcı olan, bilgi ve deneyimleri, disiplin, dürüstlüğü ve alçakgönüllülüğü ile hayatıma asla unutulmayacak değerler kazandıran, hakkını ödeyemeyeceğim çok değerli hocam Sayın Prof.Dr. Yeşim GÜROL' a

Tanıştığım günden bugüne bana hocalık, abilik, arkadaşlık yapan ve desteğini hiç esirgemeyen, gerek meslek hayatım gerekse sosyal hayatımda hep örnek aldığım, 7/24 bana yardımcı olmaktan asla usanmayan, yapmaya çalıştığım her şey de eli ve emeği olan, bir insanın hayatında sahip olabileceği en vefalı dost, sevgili arkadaşım Yrd.Doç.Dr. İskender KARALTI 'ya

Bugünlere gelmemi sağlayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, bana her zaman güç veren kocaman aileme, uzun zamandır fiziki olarak yanımda olmasa da düşüncesi bile güç veren babam Akın AKSAÇLI' ya ve tabi ki her şeyim, yaşam enerjim, mutluluk kaynağım canım oğlum Kuzey AKSAÇLI' ya

Sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Şahap AKSAÇLI

İstanbul, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ ONAY SAYFASI	ii
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
KISALTMALAR	ix
ABSTRACT	xi
ÖZET	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemokinler	4
2.1.1. Kemokin Reseptörleri	5
2.2. HIV Grupları ve Alt Tipleri	7
2.3. Epidemiyoloji	9
2.4. HIV' in Mikrobiyolojik Özellikleri	14
2.5. Patogenez ve İmmünite	17
2.6. HIV' in Hücresel Hedefleri ve Viral Replikasyon	21
2.7. HIV Tanısı	24
2.8. HIV Tedavisi	30
2.9. Korunma ve Kontrol	32
2.10. Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri	33
2.10.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	35
2.11. Elektroforez	37
3. YÖNTEMLER	38
3.1. Materyal-Metod	38
3.2. DNA İzolasyonu	39

3.3. PZR Çalışmaları	39
3.3.1. CXCR4 Kemokin Reseptörü için I. PZR Çalışmaları	39
3.3.2. CCR5 Kemokin Reseptörü için I. PZR Çalışmaları	41
3.4. CXCR4 VE CCR5 Kemokin Reseptörleri I.PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Yöntemi ile Tespit Edilmesi	43
3.5. Restriksiyon Aşaması	44
3.5.1. CXCR4 Kemokin Reseptörü Restriksiyon Aşaması	45
3.5.2. CCR5 Kemokin Reseptörü Restriksiyon Aşaması	45
3.6. Kesimi Yapılan Hedef Bölgelerin Agaroz Jel Elektroforezinde Gösterilmesi	46
4. SONUÇLAR	47
5. TARTIŞMA	55
5.1. CXCR4 ve CCR5 Kemokin Reseptörlerinde Meydana Gelen Mutasyonun HIV Enfeksiyonu Açısından Önemi	55
5.2. Dünyada CXCR4 ve CCR5 Kemokin Reseptörlerinde Meydana Gelen Mutasyon Sonucu HIV Enfeksiyonuna Karşı Oluşan Direnç ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	58
5.3. HIV Enfeksiyonuna Dirençli Mutant CXCR4 ve CCR5 Kemokin Reseptörlerine Sahip Populasyonların Saptanmasının Klinik Önemi	60
6. KAYNAKLAR	61
7. EKLER	67
7.1. Etik Kurul Karar Formu	67
7.2. Özgeçmiş	68

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1: HIV için Koreseptör Olarak Davranan Kemokin Reseptörleri	7
Tablo 2: Dünya HIV/AIDS Oranı	11
Tablo 3: Türkiye’ de Bildirilen HIV/AIDS Vakalarının Yaş Grubu ve Cinsiyete Göre Dağılımı	12
Tablo 4: Türkiye’ de Bildirilen HIV/AIDS Vakalarının Olası Bulaşma Yollarına Göre Dağılımı	13
Tablo 5: Klasik PZR CXCR4 için Kullanılan Primer Dizileri	40
Tablo 6: PZR Bileşenleri (CXCR4)	40
Tablo 7: CXCR4 için I. Aşama PZR Protokolü	41
Tablo 8: Klasik PZR CCR5 için Kullanılan Primer Dizileri	42
Tablo 9: PZR Bileşenleri (CCR5)	42
Tablo 10: CCR5 için I. Aşama PZR Protokolü	43
Tablo 11: Elektroforez İşlemi Bileşenleri	44
Tablo 12: CXCR4 için Restriksiyon Enzim Kesim Protokolü	45
Tablo 13: CCR5 için Restriksiyon Enzim Kesim Protokolü	46
Tablo 14: II. Aşama Elektroforez İşlemi Bileşenleri	47
Tablo 15: Araştırma Kapsamında ki Çalışma Grubuna Dahil 50 HIV/AIDS Negatif Bireyin Karşılaştırmalı Sonuçları	49
Tablo 16: Araştırma Kapsamında ki Kontrol Grubuna Dahil 50 HIV/AIDS Pozitif Bireyin Karşılaştırmalı Sonuçları	51

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: HIV – Hedef Hücre Füzyonu	7
Şekil 2: HIV’ in Kesiti	8
Şekil 3: Dünya HIV Prevalans Haritası	10
Şekil 4: Türkiye’ deki HIV/AIDS Vakalarının Yıllara Göre Dağılımı	14
Şekil 5: HIV’ in Şematik Görünümü	15
Şekil 6: HIV- 1’ in Genomik Yapısı	16
Şekil 7: HIV Genomik Yapısı	17
Şekil 8: HIV Yaşam Döngüsü	19
Şekil 9: HIV Evrimi	21
Şekil 10: HIV Yaşam Döngüsü	24
Şekil 11: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC)’ nin Önerdiği HIV Tanısında İzlenecek Algoritma	26
Şekil 12: Western Blot (WB) Sonucu	28
Şekil 13: Western Blot (WB)’ da İzlenecek Algoritma	28
Şekil 14 : CDC Tarafından Önerilen Algoritma için Yapılan Çalışmalar	29
Şekil 15: Antiretrovirallerin HIV’ e Etki Mekanizması	32
Şekil 16: Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Bir Siklusun Aşamaları	36
Şekil 17: Çalışma Dahilinde ki 10 Örneğe Ait DNA Bantlarının Agaroz Jel Görüntüsü (UV Işık Altında)	53
Şekil 18: Klasik PZR ve I. Aşama Agaroz Jel Elektroforezi ile CXCR4 ve CCR5 Kemokin Reseptörlerine Bakılan 50 HIV / AIDS Negatif Bireyden Oluşan Çalışma Grubunun Mutant ve Doğal Fenotip Sonuçları	54
Şekil 19: Klasik PZR Kesim Protokolü ve II. Aşama Agaroz Jel Elektroforezi ile CXCR4 ve CCR5 Kemokin Reseptörlerine Bakılan 50 HIV/AIDS Negatif Bireyden Oluşan Çalışma Grubunun Mutant ve Doğal Fenotip Sonuçları	54
Şekil 20: HIV’ in Giriş Kapısının Bloke Edilmesi	56
Şekil 21: Vektör Virüsün HIV Enfekte Hücreye Bağlanması	57

KISALTMALAR

PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HIV	: Immune Deficiency Syndrome
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
LAV	: Lymphadenopathy Associated Virus
NIH	: National Institutes of Health
HTLV	: Human T Lymphotropic Virüs
ARV	: AIDS associated retrovirüs
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
LTRs	: Long Terminal Repeats
SU	: Surface
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
ELISA	: Enzim linked immunosorbent assay
TM	: Transmembrane
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
Bp	: Base pair
Kd	: Kilodalton
Kb	: Kilobaz
SDF	: Stromal cell derived factor
MIP	: Macrophage inflammatory protein
LARC	: Liver and Activation- regulated chemocine
MCP	: Monocyte chemoattractant protein
NK	: Naturel killer
IL	: Interlökin
DARC	: Duffy antigen receptor for chemocine
PI	: Plasmodium
RANTES	: Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted
M	: Main
O	: Outlier
N	: Novel
CRF	: Circulating recombinant form

UNAIDS	: Birleşmiş Milletler HIV/AIDS ortak programı
Nm	: Nanometre
UV	: Ultraviolet
SIV	: Simian İmmün Yetmezlik Virusu
HAART	: Highly active antiretroviral therapy
RT	: Revers Transkriptaz
NRTIs	: Nükleozid Revers Transkriptaz İnhibitörleri
NNRTIs	: Nükleotid Analogu Revers Transkriptaz İnhibitörleri
PR	: Proteaz
IN	: Integraz
Tat	: Transaktivatör
Rev	: Regülatör
MHC	: Major histocompatibility complex
PML	: Progressif multifokal lökoensefalopati
HSV	: Herpes simplex virüs
CMV	: Cytomegalovirus
EBV	: Epstein-Barr virüs
HHV-8	: Human herpesvirüs 8
JC	: John cunningham virüs
NAT	: Nükleik asit testi
WB	: Western blot
IFA	: Immunofloresan assay
RIPA	: Radioimmunopresipitasyon
Pi	: Proteaz inhibitörleri
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
EB	: Etidyum bromür
TBE	: Tris borate edta
RE	: Restriksiyon endonükleazlar

ABSTRACT

Aksaçlı, Ş. (2019) . Detection of HIV Resistance Due to Gene Polymorphism in Chemokine Receptors in Healthy Individuals. Yeditepe University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine, MSc thesis, İstanbul.

Human immunodeficiency virus (HIV) causes acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). It was first described in 1980 as a disease and now has become a world-wide pandemic. It was first identified in Sub-Saharan Africa. Nowadays, it is known that some individuals have an innate immunity to HIV because of the gene polymorphism occurring congenitally in the chemokine receptors. Under normal conditions, two chemokine receptors promoting the entry of HIV-1 into the target cell after the initial binding of gp120 protein to CD4 on lymphocytes and monocytes were defined, and these co-receptors are called CCR5 and CXCR4. In this study, the correlation between the polymorphism of the relevant genes, which are thought to create inborn resistance to HIV, and innate immunity to HIV was investigated in order to contribute to enlighten the genetic basis in the formation of innate immunity to HIV. The study included 50 previously diagnosed HIV/AIDS positive individuals as the control group and 50 HIV/AIDS negative individuals as the study group on a volunteer basis and within the framework of ethics rules by giving particular importance to individual privacy after their individual written consents were obtained. Peripheral blood samples were taken from a total of 100 individuals included in the study and control groups in EDTA and gel tubes along with their detailed medical history in Yeditepe University, Medical Faculty Hospital by signing consent form. HIV/AIDS positivity and negativity of all individuals in the study were redemonstrated by studying the serum samples obtained from gel tubes on immunoassay system (Siemens, Germany) using the ELISA method. Serums were separated from the blood samples of the individuals in other gel tubes and DNA isolation was performed from this serum portion. Using the appropriate primers from the isolated DNA samples, the target region was amplified by Classical Polymerase Chain Reaction (PCR), and in the next stage, using the the restriction enzymes and carrying out the cutting protocol, our target region was cut on a thermal cycler (Techne, England) device with restriction enzymes, and then processed with the agarose gel electrophoresis method, and the bands obtained were compared on a gel imaging device (Biorad, USA). The DNA band images we obtained as a result of this study revealed that there was no mutation in CXCR4 and CCR5 chemokine receptors of

50 HIV negative individuals in our study group. In other words, 50 individuals participated in our study did not have resistance to HIV infection subjects in CXCR4 and CCR5 chemokine receptors as a result of innate mutation. The agarose gel electrophoresis performed after the restriction stage showed that the resulting DNA bands of all cases were 236bp for CCR5 and 190bp for CXCR4, that is, all individuals had a wild type DNA molecule and they did not have any gene polymorphism in CXCR4 and CCR5 chemokine receptors, and accordingly indicating that the individuals had no resistance to HIV virus. If the band size that we obtained on the agarose gel for CXCR4 chemokine receptor was about 173 bp, we would have detected the presence of a mutation in this case. Likewise, if the band size that we obtained on the agarose gel for the CCR5 chemokine receptor was about 201 bp, we would have also mentioned a mutation, gene polymorphism. A limited number of people are resistant to HIV infection, because these people have a mutation in CCR5 and CXCR4 chemokine receptors, which are co-receptors. People who have homozygous deletions in CCR5 gene are resistant to the infection despite encountering the virus many times. It has been found that some of the infected individuals who are heterozygous for this deletion do not reach the AIDS stage for a long time.

Key words : HIV, AIDS, Chemokine Receptors, Polymorphism, Resistance to HIV Infection.

ÖZET

Aksaçlı, Ş. (2019) . Sağlıklı Bireylerdeki Kemokin Reseptörlerinde Meydana Gelen Gen Polimorfizmi Nedeni ile Oluşan HIV Direncin Saptanması. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD., Master Tezi, İstanbul.

İnsan immün yetmezlik virüsü yani HIV, edinsel immün yetmezlik sendromuna yani AIDS' e neden olur. İlk defa 1980 yılında tanımlandı, şimdi ise dünya çapında bir pandemi haline gelmiştir. İlk olarak sub-Saharan Afrika da saptandı. Günümüzde bilinmektedir ki ; bazı birey kemokin reseptörlerinde doğumsal olarak meydana gelen gen polimorfizminden dolayı HIV' e karşı doğal bir bağışıklığa sahiptirler. Normal şartlarda lenfositler ve monositler üzerinde CD4 ile gp120 proteini arasında ilk bağlanmadan sonra HIV-1'in hedef hücreye girişini iletken iki adet kemokin reseptörü tanımlanmıştır ve bu reseptörler CCR5 ve CXCR4 olarak adlandırılırlar. Bu çalışmada, doğumsal HIV bağışıklık oluşumunda genetik zeminin aydınlatılmasına katkıda bulunabilmek amacıyla HIV doğal direncini oluşturduğunu düşündüğümüz ilgili genlerin polimorfizmi ile HIV doğal bağışıklık arasındaki ilişki araştırıldı.Çalışmada gönüllülük esasına dayanarak ve etik kurallar çerçevesinde kişi mahremiyetini ön planda tutarak daha önce tanısı konulmuş 50 HIV/AIDS pozitif birey yazılı onamları alınarak kontrol grubu olarak, 50 HIV/AIDS negatif birey de yine yazılı onamları alınarak araştırma grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Çalışma ve kontrol grubuna dahil toplam 100 bireyden detaylı öyküleri ile birlikte periferal kan örnekleri EDTA(Etilendiamin tetraasetik asit)'lı ve jelli tüplere onam formu imzalatılarak Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde alındı. Çalışma kapsamında ki tüm bireylerin HIV/AIDS pozitif ve negatiflikleri ; jelli tüplerden elde edilen serum örnekleri kullanılarak immunoassay sistemin de (Siemens,Almanya) ELISA yöntemi ile çalışılarak tekrar gösterildi . Bireylere ait diğer jelli tüplerdeki kan örneklerinden serumları ayrıldı ve bu serum kısmından DNA izolasyonları yapıldı. İzole edilen DNA örneklerinden uygun primerler kullanılarak hedef bölge Klasik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı, bir sonra ki aşamada restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim protokolü uygulanarak thermal cyler (Techne,İngiltere) cihazın da hedef bölgemiz restriksiyon enzimleri ile kesildi ve ardından agaroz jel elektroforezi yöntemi ile yürütülüp sonucunda elde edilen bantlar jel görüntüleme cihazın

(Biorad,ABD) da görüntülenerek karşılaştırıldı.Yaptığımız bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz DNA bant görüntülerinde anlaşıldı ki çalışmaya dahil olan çalışma gurubumuzda ki 50 HIV negatif bireyin sahip oldukları CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörlerin de bir mutasyon mevcut değildir. Yani araştırmaya katılan 50 birey çalışma konumuz olan CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörlerin de doğuştan gelen mutasyon sonucu HIV enfeksiyonuna karşı dirence sahip değildirler. Gerçekleştirilen restriksiyon aşamasının ardından yapılan agaroz jel elektroforez yöntemi ile görülmüştür ki tüm olgulara ait oluşan DNA bantları CCR5 için 236bp, CXCR4 için ise 190bp büyüklüğünde'dir, yani tüm bireylerin doğal fenotip DNA molekülüne sahip olduklarını CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörlerinde bir gen polimorfizmine sahip olmadıklarını buna bağlı olarakta bireylerin HIV enfeksiyonuna karşı bir dirençlerinin olmadığını gösterir. Eğer CXCR4 kemokin reseptörü için agaroz jel üzerinde elde ettiğimiz bant yaklaşık 173 bp olsaydı, bu durumda bir mutasyon varlığını tespit etmiş olurduk. Aynı şekilde CCR5 kemokin reseptörü için agaroz jel üzerinde elde ettiğimiz bant 201 bp civarında olsaydı, bir mutasyon, gen polimorfizminden bahsetmiş olacaktık. Az sayıda insan HIV ile enfeksiyona dirençlidir, çünkü bu insanların yardımcı reseptörleri olan CCR5 ve CXCR4 kemokin reseptörlerinde mutasyon vardır. CCR5 geninde homozigot delesyon içeren kişiler virüsle çok kez karşılaşmalarına rağmen enfeksiyona dirençlidirler. Bu delesyon için heterozigot olan bazı enfekte kişiler ise, uzun süre AIDS aşamasına gelmedikleri tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimerler : HIV, AIDS, Kemokin Reseptörü, Polimorfizm, HIV Enfeksiyonuna Direnç.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan immün yetmezlik virüsü yani HIV , einsel immün yetmezlik sendromu yani AIDS' in etkenidir. 1981'de ilk Pneumocystis carini pnömonisi ve Kaposi sarkomu vaka grupları tanımlandığı zaman bunun insanlık tarihinin en önemli pandemilerinden birinin başlangıcı olduğu ve 20 yıldan az bir süre içinde 50 milyon insanın etkileneceği bilinmiyordu.

Hastalıkla ilgili bilgilerimiz önceden kalıtsal bağışıklık yetersizliği hastalıkları olmayan hastalarda, olağan olmayan fırsatçı enfeksiyon vakalarında dramatik bir artış gözlenmesi ile başladı. Sonuç olarak, İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) ve Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu(AIDS) ; tıbbi literatür ile konuşma diline girdi (1,2,3).

İnsanlar arasında karşımıza çıkan en ilgi çekici özellik, bazı bireylerde doğumsal olarak ortaya çıkan ve kemokin reseptörlerinde meydana gelen gen polimorfizmi nedeni ile bu bireylerde var olan HIV enfeksiyonuna karşı olan doğal bağışıklığıdır .

Lenfositler ve monositler üzerinde CD4 ile gp120 arasında ilk bağlanmadan sonra HIV' in hedef hücreye girişini ilerleten kemokin reseptörleri CCR5 ve CXCR4 reseptörleridir. CCR5 ve CXCR4 kemokin reseptörleri arasında ki direk etkileşim ile edinsel bağışık yanıtın ana hücreleri enfekte olur . Konağın bağışık yanıtına ek olarak konağa özgü genetik faktörler , HIV-1 ile enfeksiyona duyarlılığı , direnci ve hastalığın ilerleme hızını belirler.En önemli faktör HIV-1'in CD4+T hücrelerine girişinde ana koreseptör olan CCR5 reseptöründeki delesyondur. Bu 32 baz çiftlik delesyon (CCR5delta32) için homozigot olanlar hücre yüzeylerinde bu koreseptörü taşımazlar ve böylelikle enfekte olmazlar. Böylelikle CCR5 delta 32 homozigot kişiler HIV-1 enfeksiyonuna önemli ölçüde direnç gösterirler (4).Aynı şekilde CXCR4 reseptöründe meydana gelen mutasyon sonucu , bu reseptörde hücre yüzeyinde taşınmamaktadır ve bu bireylerde HIV enfeksiyonuna karşı direnç gösterirler.

Bu çalışmada C-X-C kemokin reseptör 4 (CXCR4) ve C-C-R kemokin reseptör 5 (CCR5) hedef gen bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile anlamlı seviyede çoğaltılması, ardından yapılan PZR işlemi ile elde edilen DNA moleküllerinin agaroz jel elektroforez yöntemi ile jel üzerinde gösterilmesi, anlamlı bantlar elde edildiğinde bu DNA moleküllerini bölgeye spesifik restriksiyon enzimleri ile işleme alıp çalışma açısından anlamlı bölgenin elde edilip çoğaltılması ve en nihayetinde aradığımız mutasyona özel bölgeyi agaroz jel elektroforezinde UV(ultraviolet) ışık ve kamera

altında görüntülenerek doğal fenotip yada mutant olabilme durumunun karşılaştırılması amaçlandı.



2.GENEL BİLGİLER

İnsan immün yetmezlik virüsü olarak adlandırılan HIV, edinsel immün yetmezlik sendromu olarak adlandırılmış hastalık tablosu olan AIDS' in etkenidir. Günümüzde tüm Dünya'yı etkisi altına alan bir pandemi haline gelmiştir. İlk odak sub-Saharan Afrika'da saptandı ve orada yapılan tahminlere göre toplumun %25'i etkilenmiş durumdadır.

İlk başta bulaş; homoseksüel, orogenital ya da anogenital temas ile gerçekleşmekteydi; fakat şimdilerde majör bulaşma şekli heteroseksüel ilişki iledir. Virüs mukozal travma sonucu vücuda giriş yapabilir fakat HIV-1'in lamina propiyanın nükleer hücrelerine girdiği majör hücreyel yol epitelyal hücreler, M hücreleri ve dendritik hücre yoluylaadır. Yüksek viral yük, mukozal travma ve enflamasyon, alıcı partnerin mukozal enfeksiyonu, riskli cinsel temasın sayısının artması, korunmasız cinsel temas, alıcı anal birleşme, verici erkek partnerin sünnetsiz olması bulaş riskini arttıran yüksek risk faktörleridir(1).

AIDS etkeni olan virus, 1983 yılında; Fransa'da Jean-Claude Chermann laboratuvarında Françoise Barré-Sinoussi tarafından ve Pasteur Enstitüsü'nde Luc Montagnier başkanlığındaki ekibin çalışmasıyla ilk kez tanımlanmıştır. 1984 yılında Amerika Birleşik Devletleri' nde Ulusal Sağlık Enstitüsü' nde (NIH; National Institutes of Health) Robert Gallo ve arkadaşları tarafından ve aynı zamanda California Üniversitesi' nde Jay Levy ve arkadaşları tarafından saptanmıştır.

Pasteur Enstitüsü' ndeki araştırmacıları tarafından, virusa lenfadenopatisi olan genç bir eşcinsel erkekte izole ettikleri için "lenfadenopati ile ilişkili virüs (lymphadenopathy associated virüs)" LAV olarak isimlendirilmiştir. NIH araştırmacıları, T lenfosit hücrelerine ilgisinden dolayı "LAV (İnsan T Lenfotik Virüs - Human T Lymphotropic Virus) adı verilmiştir; daha önceden bilinen diğer iki HTLV'nin ardından geldiği için HTLV-III adını vermişlerdir. Daha sonra bu HTLV-III'ün Pasteur Enstitüsü'nde izole edilen virusdan kontaminasyon olduğu görülmüştür. Levy grubu ise "AIDS ile ilişkili retrovirus" (AIDS associated retrovirus; ARV) adını vermiştir. Elektron mikroskopik çalışmalar bu virusların retrovirusler içinde lentiviruslarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi Lentivirus ailesine ait olduğu belirlenen virüsü "İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (Human Immunodeficiency Virus)" kısaca HIV olarak tanımladı. 1986'da Clavel, Montagnier ve arkadaşları farklı bir HIV izole etmişlerdir. Özellikle Batı Afrika'nın bazı bölgelerinde yaygın olan bu tipe HIV-2 adı verildi. Afrika, Asya, Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika' da yaygın

olarak saptanan HIV-1'e göre HIV-2 ile enfekte olan bireylerde hastalık tablosunun geç dönemlerde kendini gösterdiği ve mortalite oranının çok daha düşük olduğu saptanmıştır(2, 3).

2.1. Kemokinler

Kemokinler farklı hücrelerin aktivasyonuna neden olan ve seçici bir şekilde aktive ettiği bu hücreler ile ilişkili olan bir polipeptid ailesidir. İnflamasyon, enfeksiyon, doku hasarı, allerji, kardiyovasküler hastalıklar, ayrıca malign tümör patofizyolojisinde rol alırlar(4). Kemokin ailesine ait 30 adet kemokin ve 15 adet kemokin reseptörü tanımlanmıştır. Elias Metschnikoff yaptığı çalışmalar ile lökositlerin buldukları kandan dokulara kapiller damarların duvarlarından geçerek inflamasyonun olduğu dokularda yığınlar oluşturduklarını gösterdi. Diapedez adı verilen bu göçün, yığılmanın sebebinin bakteri ya da virüsü kısıtlayıp imha etmek olduğu ve immün sistem için hayatsal öneme sahip olduğu Metschnikoff tarafından yapılan çalışmalar ile anlaşıldı. Diapedez, enfeksiyon hastalıkları ve enflamasyon, anjiyogenezis, hematopoezis, organogeneziste rol alan sitokin ailesine kemotaktik sitokinler düşünülerek "Kemokin" ismi verilmiştir(5,6,7).

Kemokinler 8-10 kilodalton (kd) ağırlığında, %20-70 oranında aminoasit dizilimlerinde benzerlik gösteren proteinlerdir(8). Sistein kalıntılarının pozisyonlarına ve genetik yapılarındaki farklılıklara göre 4 alt gruba ayrılırlar. Tüm kemokinler 3 beta (b) tabakası ve C terminal a heliks yapısı açısından benzerlik gösterirler(9,10).

CXC kemokin ailesi olarak da bilinen kemokin ailesinde N terminaline yakın 2 sistein aminoasidi farklı bir aminoasit tarafından ayrılmıştır. Bu kemokinin kromozomu 14q12-21 üzerindedir. Bu grupta sadece SDF- 1a (Stromal cell derived factor) 1053 kromozomundadır. Bu kemokinler nötrofillere etki ederken; lenfositlere karşı etkisizdirler. CC kemokinlerde (b kemokin) diğer kemokinlerden farklı olarak N terminaline yakın 2 sisteini ayıran aminoasit yoktur. CC kemokin yani b kemokin geni 17q 11.2-12' dedir. Sadece MIP-3p (Macrophage inflammatory protein) kromozomu 9117'de, MIP-3a/ LARC (MIP-3_/ liver-and activation- regulated chemokine)'da kromozom 2117a'dadır. CC kemokinler de kendi içinde 5 MCP (Monocyte chemoattractant protein) ve eotaksin içeren MCP-eotaksin ailesi ve diğer b kemokinler olmak üzere 2 alt gruba ayrılır. CC kemokinler yani b kemokinler genel olarak nötrofil hücrelerine karşı etkili değilken; monosit, bazofil, eozinofil ve lenfositlere karşı gösterdikleri etki değişik ölçülerdedir. C kemokin olarak adlandırılan Lenfotaktin, tek

sistein içerir ve kromozomu ise 1q23'dedir. CX3C kemokinin ise Fraktalkin veya Nörotaktin olarak adlandırılmaktadır ve geni 16. kromozomda bulunmaktadır(8, 9, 10).

2.1.1. Kemokin Reseptörleri

Kemokinlerin öncülük yaptıkları diapedez ve selektif olarak etki ettikleri hücrelerin aktive edilmesi için kemokin moleküllerinin özgü oldukları hücreler üzerindeki özel reseptörlerine bağlanmaları şarttır. Yapılan çalışmalar ile 3 grup kemokin reseptörü tanımlanmış olup bunlarda kendi içlerinde sınırlı sayıda üyeye sahiptirler: dört tane CXC (CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4), sekiz tane CC kemokin reseptörü (CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8) ve son olarakta bir adet CX3C (CX3CR) tanımlanan kemokin reseptörleridir(8). Kemokin reseptörleri arasında CXCR1 gibi nötrofilde yani tek bir hücrede yoğunlaşanlar olduğu gibi, CCR2 gibi T lenfosit hücrelerinde, NK hücrelerinde, dendritik hücreler ve de bazofilde etkin olan yani birden fazla hücrede aktivite gösteren kemokin reseptörleri de mevcuttur. CCR1 ve CCR2 kemokin reseptörleri spesifik olarak monositlerde mevcutken; IL-2 uyarımı sonrasında lenfositlerde de tespit edilmektedirler. CCR2 kemokin reseptörleri lipopolisakkaritlerin varlığında azalır ve hücreleri sadece bu reseptörü aktive eden MCP-1'e karşı cevapsız kılar; fakat CCR1 ve CCR5'i aktive eden MIP-1a'ya karşı hücrenin hali hazırda bir cevabı vardır. Buna karşın diğer kemokin reseptörlerinin ortaya çıkması farklı hücre tiplerinin ayrılmasından ve aktivasyonundan sorumludur(9, 10, 11). Bazı kemokin reseptörleri nöronlar, astrositler, epitelial hücrelerde de bulunur. Bu da kemokin sisteminin lökosit göçü dışında diğer sistemlerde de birtakım fonksiyonları olduğunu göstermektedir. Kemokin reseptörlerinin bir çoğu birden fazla kemokin ile bağlanabilmektedir; ancak CC kemokin reseptörleri birtek CC kemokinleri ile, CXC kemokin reseptörleri de sadece CXC kemokinleri ile spesifik olarak bağlanırlar. Ligand ile reseptörü arasındaki bu özel bağlanma primer, sekonder, tersiyer yapıları bakımından aynı olan fakat kuaterner yapı bakımından yapısal farklılık göstermelerinden kaynaklanmaktadır. Reseptör uyarımı; inozitoltrifosfat oluşumu, hücre içi kalsiyum artışı ve protein kinaz C aktivasyonuna yol açarak hücrenin aktivasyonunu sağlar. Kemokinler ayrıca 2 tane sinyal üretmeyen moleküle de bağlanırlar. Bunlardan bir tanesi; eritrosit kemokin reseptörü olarak da adlandırılan DARC (Duffy Antigen receptor for chemokine)' dir ve bu reseptör eritrosit ve endotelial hücrelerde bulunmaktadır. Bu reseptörün görevinin CC ve CXC kemokinleri

bağlayıp, dolaşımdan uzaklaştırmak olduğu düşünülmektedir. Diğeri ise heparan sülfat proteoglikan grubudur. Heparan sülfat proteoglikanlar ekstrasellüler matrikste ve endotelial hücre yüzeyinde kemokinleri tutar ve bölgesel bir yoğunluk farkı oluşturarak kemokin salımına yol açar(11, 12).

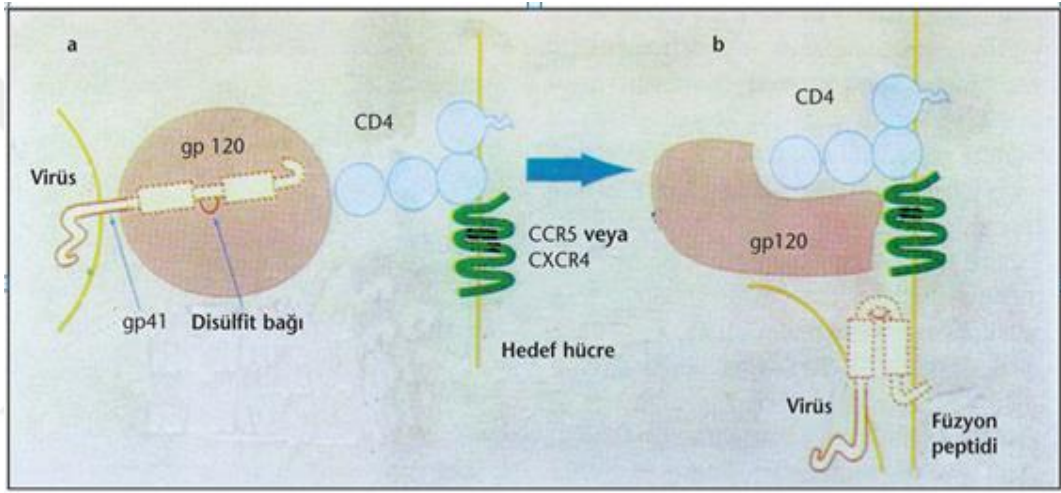
Kemokin reseptörleri 2 önemli insan patojeni için (Plasmodium ve HIV) ko-reseptör taşırlar. Plasmodium vivax (Pl.) eritrositler üzerindeki DARC kemokin reseptörüne, HIV ise lenfosit ve makrofajlardaki CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörlerine bağlanır. Bu reseptörler hücreye girişi kolaylaştırarak viral tropizmi belirler. HIV başlangıçta virionu saran glikoprotein gp 120/41 ile en azından 2 hücrel reseptör (CD4 molekülü ve kemokin reseptörü) ile etkileşime girer (Şekil 1). HIV-1'in makrofaj tropik suşu yani M-tropik suşu CCR5 kemokin reseptörünü kullanırken, T tropik suşu ise; T hücrede bulunan CXCR4 reseptörüne az bir kısmı da CCR5'e bağlanır (Tablo 1).

CCR5 geninde 32-baz-çift delesyonu için homozigot olan bireyler HIV-1 enfeksiyonuna dirençli olup, heterozigot olan bireylerde ise hastalık ilerleyici seyretmez ve fırsatçı enfeksiyonlara karşı koruyucudur. Ayrıca ko-reseptör olarak nadiren kullanılan CCR2' deki allellik varyantı ve SDF-1 geninde de mutasyonu olan bireylerde AIDS'in ilerlemesinin geciktiği görülür. CCR2 mutasyonu CCR5 promotör mutasyonu ile birlikte olabilir; bu durumda enfeksiyona karşı koruyucudur(11, 12, 13).

Tablo 1: HIV için koreseptör olarak davranan kemokin reseptörleri (64).

Reseptör	HIV özgülüğü	Hüresel dağılımı
CXCR4	T-hücre tropik	Geniş*
CCR5	M-tropik	Geniş**
CCR3	Dual tropik, M-tropik	Eozinofiller
CCR2b	Dual tropik, T-tropik	Mononükleer fagositler

* Neoplastik T hücre ve promonositik hücre dizileri (periferik kan hariç)
** Primer T hücreleri, mononükleer fagositler, dendritik hücreler

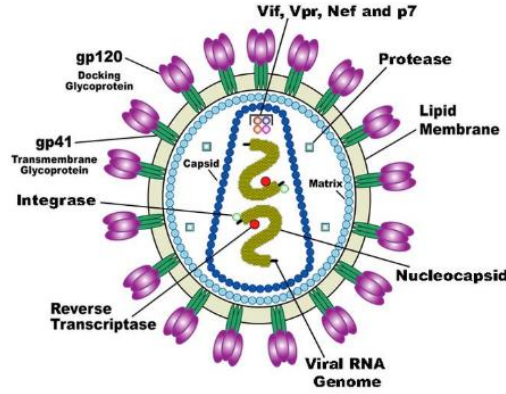


Şekil 1: HIV- Hedef hücre füzyonu (64).

2.2. HIV Grupları ve Altıpleri

Her iki HIV virüsü de *Retroviridae* ailesi içinde yer alan Lentivirüs genusunun üyesidir. Hızlı mutasyon ve rekombinasyon sebebiyle çok sık değişkenlik gösteren bir virüs olan HIV farklı grup ve altıplere sahiptir (Şekil 2).

HIV-I ‘‘main’’ (M), ‘‘outlier’’ (O) ve ‘‘novel’’ (N) olmak üzere 3 gruba sahiptir. M (main) grubu tüm dünyadaki izolatların yaklaşık %95’ini oluşturur. M grubu kendi içinde A, B, C, D, E, F, G, H, J, K olmak üzere 9 subgrup ve rekombinasyon sonucu meydana gelmiş 15 ‘‘circulating recombinant form – CRF’’ içerir. O grubundaki izolatlar, M grubundaki birbirinden farklı altıplar kadar değişkenlik göstermesine rağmen, sayıları sınırlı olduklarından ayrıca bir sınıflandırma yapılmamıştır. HIV-II A’ dan E’ ye kadar 5 altıpe sahiptir(3).



Şekil 2: HIV virüsünün kesiti

HIV-I alttip B; Kuzey Amerika, Avrupa, Avustralya ve diğer kıtalardaki şehir merkezlerinde olan epidemilerden sorumludur. Tayland ve Güney Doğu Asya’ da en fazla görülen alttip E’ dir. Brezilya ve Romanya’ da alttip F, alttip G ise Rusya’ da bulunmuştur. HIV-I ‘ in tüm alttipleri Sahraaltı Afrika’ da karşımıza çıkar ve bunlar arasında en sık görülen alttipler A, C ve D’ dir. M grubundaki alttipler, AIDS pandemisinden sorumludurlar ve tüm dünyada hızla yayılım göstermektedirler. Grup O ise nadiren karşımıza çıkmakta olup Gabon, Kamerun ve Orta Afrika’ nın batısında görülür(14,15).

Türkiye’ de , İstanbul’ da dizi analizi yöntemiyle 27 hasta ile yapılan bir çalışma sonucunda 27 hastadan 4’ ü subtip A, 19’ u subtip B, biri subtip C, biri subtip D ve ikisi F1 alttipi olarak saptanmıştır. Ülkemizde yapılan genotipik direnç değerlendirmeleri sırasında iki rekombinant HIV kökeni tespit edilmiştir. Geno2pheno sonuçlarına göre bu iki köken 03_AB ve 02_AG rekombinant formlar olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmalara göre B genotipi oranı yüksek seviyede olmakla birlikte diğer genotip ve CRF’ lere de ülkemizde rastlanmaktadır(16, 17).

2.3. Epidemiyoloji

HIV'in bir maymun immün yetmezlik virüsünden kaynaklandığı düşünülmüş ve genetik olarak en çok şempanze virüsüne yakın bulunmuştur(18).

İlk insan enfeksiyonları 1930' larda Afrika' da oluştu ancak fark edilmedi. 1960' lardan sonra insanların şehirlere göçü virüsü merkezlere taşıdı ve seks işçiliğinin kültürel kabülü HIV ile enfeksiyonun toplumda yayılmasını kolaylaştırdı(19). Bulaşma şekli ve biyolojisi, gelişmekte olan ve endüstrileşmiş ülkelerde aynı olmasına karşın, davranışsal faktörlerin ve sosyoekonomik şartların çeşitliliğinden dolayı HIV' in epidemiyolojisinde farklılıklar vardır(3). HIV' in başlıca bulaşma yolları; riskli cinsel temas, virüs ile kontamine olmuş kan ve kan ürünlerine parenteral temas ve HIV ile enfekte olmuş anneden bebeğine bulaştır. Diğer cinsel yolla bulaşan hastalıkların örneğin sifiliz ve gonorenin varlığı bulaşma riskini on kat daha fazla artırır. Farklı partner ile artan sayıda cinsel temas da bulaşma riskini artırır. HIV tükrükten de izole edilmiştir, ancak HIV' in öpüşme ile geçtiği henüz bildirilmemiştir(3).

1981 Yılında ilk HIV/AIDS olguları, San Fransisco' da yaşayan eşcinsel erkeklerde tanımlanmıştır. Bunu takiben ilave vakalar, damar içi ilaç bağımlıları, hemofili hastaları ve kan transfüzyonu alıcıları gibi yüksek risk gruplarında saptanmıştır (3).

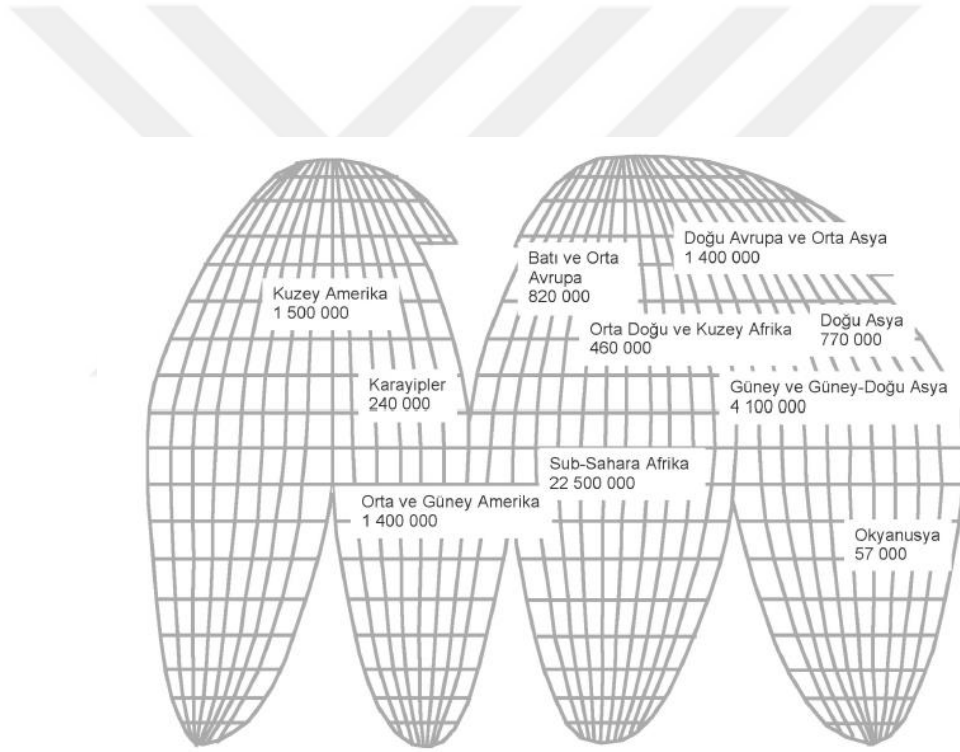
Son 30 yıldaki HIV epidemisinin evrimi 4 ana evreden oluşmuştur. Bu evreler; ani ortaya çıkış, yayılma, yükselme ve sabit kalmadır. Gelişmekte olan ülkelerde hayat kadınları ve onların müşterileri gibi yüksek risk gruplarında, endüstrileşmiş ülkelerde ise erkek eşcinseller arasında hızla yayılmıştır. Nüfus göçü aracılığı ile dünyanın çeşitli bölgelerine hızla yayıldığı " yayılma faz" ın da uluslararası seyahatlerinde önemli rolü olmuştur(20).

2006 ' da her yıl 6,6 milyon yeni HIV enfeksiyonunun oluştuğu ve AIDS' e bağlı ölüm sayısının yılda 305 milyon olduğu tahmin edilmişti(18).

Aralık 2010 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Birleşmiş Milletler HIV/AIDS Ortak Programı (UNAIDS) tarafından ortaklaşa oluşturulup açıklanan verilere göre; 2009 yılında günde 7000 yeni HIV enfeksiyonu vakası bildirilmiştir. Buna karşın HIV epidemisinin maksimum noktaya ulaştığı 1999 yılından günümüze HIV ile enfekte birey sayısında %19 azalma gözlenmektedir. Sub-Sahara Afrika 2009 yılında %67 gibi bir oran ile tüm Dünyada ki en fazla HIV ile enfekte birey sayısına

sahipbölge olmuştur (Şekil 3). Orta ve Güney Amerika bölgesinde ise Brezilya HIV ile enfekte birey nüfusunun en fazla olduğu ülke olmuştur.

Kuzey Amerika ve Batı-Orta Avrupa’ da en fazla görülen bulaş yolu eşcinsel erkek ilişki yoludur. 2007 yılında yapılan istatistikler, Batı - Orta Avrupa bölgesinde Birleşik Krallık sınırları dahilinde ve Kuzey Amerika da eşcinsel erkekler arasındaki HIV enfekte bireylerin sayısının en yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir. Karayipler, Sub-Sahara Afrika gibi bölgelerde ise HIV ile enfekte bireylerden oluşan popülasyonun büyük bir kısmının kadınlardan oluştuğu, HIV enfekte popülasyonda ki erkek birey sayısının kadınlara göre daha az olduğu görülmektedir(21, 22, 23).



Şekil 3 : Dünya HIV Prevelans Haritası (57)

Tablo 2 : Dünya HIV/AIDS Oranı (57)

HIV/AIDS ile yaşayanlar	
Total	33.3 milyon
Erişkin	30.8 milyon
Kadın	15.9 milyon
15 yaş altı	2.5 milyon
2009 yılında HIV enfekte yeni vakalar	
Total	2.6 milyon
Erişkin	2.2 milyon
15 yaş altı	370.000
2009 yılında HIV/AIDS hastalığından ölenler	
Total	1.8 milyon
Erişkin	1.6 milyon
15 yaş altı	260.000

Türkiye’ de ilk olgu 1985 yılında İstanbul’ dan bildirilmiştir. 2000 yılı sonunda Sağlık Bakanlığı’ na bildirilen HIV ile enfekte kişi sayısı 1067’dir. Çoğu İstanbul şehrinden bildirilmiş olup yaşları 20 ile 49 arasındadır. Risk gruplarına göre dağılım sırası heteroseksüel, eşcinsel ve damar içi madde bağımlıları şeklindedir. Olguların hemen hemen hepsi HIV-1 ile enfektedir. Türkiye’ den ilk HIV-2 Bombay’ da böbrek transplantasyonu olmuş bir hastadan bildirilmiştir(24, 25).

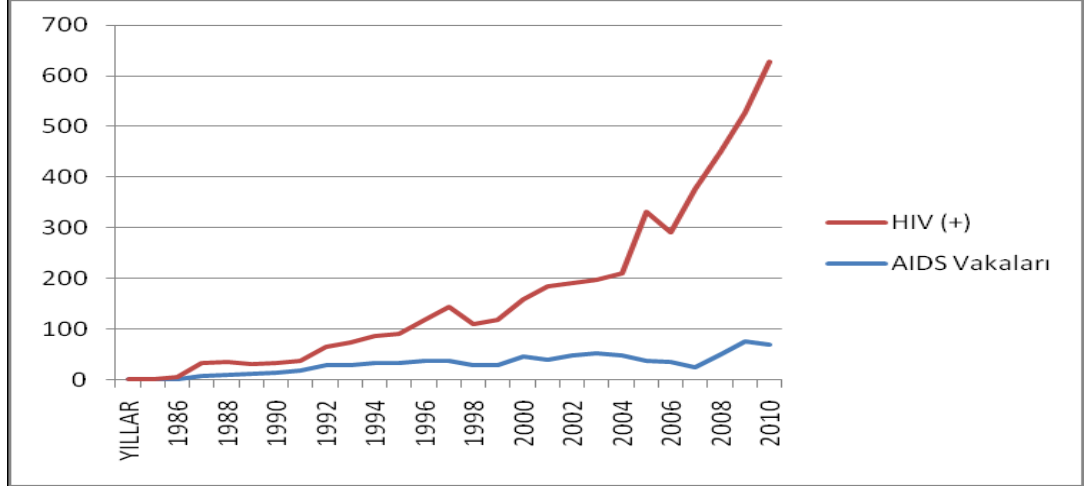
Tablo 3 : Türkiye’ de Bildirilen HIV/AIDS Vakalarının Yaş Grubu ve Cinsiyete Göre Dağılımı (01 EKİM 1985 – 31 ARALIK 2017 , T.C Sağlık Bakanlığı)

YAŞ GRUBU	ERKEK	KADIN	TOPLAM VAKA
0	49	29	78
1-4	37	32	69
5-9	17	13	30
10-14	17	12	29
15-19	259	98	357
20-24	1642	473	2115
25-29	2420	685	3105
30-34	2449	658	3107
35-39	2062	520	2582
40-44	1526	354	1880
45-49	1256	236	1492
50-54	902	207	1109
55-59	626	165	791
60-64	383	88	471
65 ve üstü	378	83	461
Yaşı bilinmeyen	147	61	208
TOPLAM	14170	3714	17884

Türkiye’ de HIV/AIDS vakalarının yoğun olduğu yaş aralığı 20-49 yaş aralığıdır. Türkiye’ deki varolan HIV/AIDS vakalarının bulaşma yollarına göre istatistiklere bakarsak heteroseksüel cinsel ilişki ile bulaş oranı %52.4, eşcinsel cinsel ilişki ile bulaş oranı %8.1, damar içi uyuşturucu madde bağımlılığı ile bulaş oranı %5.1 sürekli transfüzyon ile kan nakli alanlarda bulaş oranı %1.9, enfekte anneden bebeğine geçişin oranı %1.8, hemofili hastalığından kaynaklı bulaş oranı %0.4, en sıkıntılı oran ise %29.8 gibi yüksek bir oran ile sebebi belirsiz bulaştır(26).

Tablo 4 : Türkiye’ de Bildirilen HIV/AIDS Vakalarının Olası Bulaşma Yollarına Göre Dağılımı (01 Ekim 1985 – 31 Aralık 2017,Türkiye Halk Sağlığı Müdürlüğü)

OLASI BULAŞMA YOLU	TOPLAM VAKA	YÜZDE
Heteroseksüel cinsel ilişki	6403	%35.80
Homoseksüel/biseksüel cinsel ilişki	2499	%13.97
Damar içi madde bağımlılığı	245	%1.37
Anneden bebeğe geçiş	156	%0.87
Hemofili hastaları	23	%0.13
Kan ve kan ürünleri transfüzyonu	97	%0.54
Nozokomiyal bulaşma	78	%0.44
Homoseksüel/biseksüel cinsel ilişki + madde bağımlılığı	171	%0.96
Bilinmeyen	8554	%47.83
TOPLAM	17884	%100

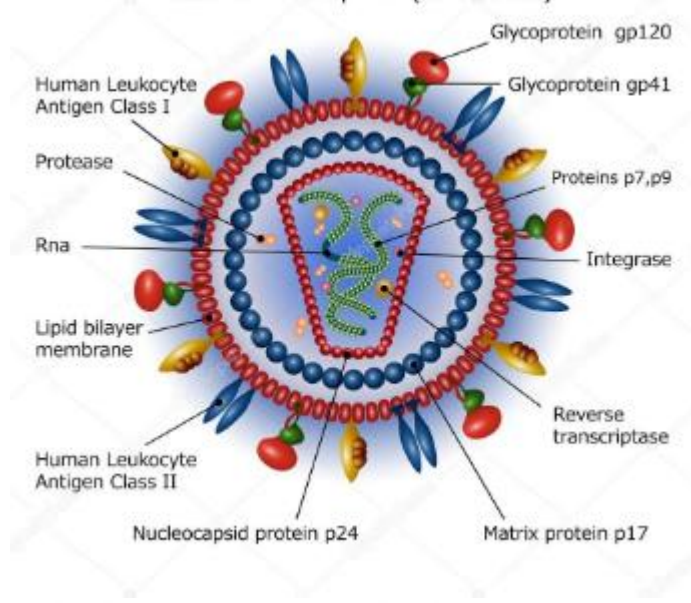


Şekil 4 : Türkiye’ de ki HIV/AIDS vakalarının yıllara göre dağılımı (59)

2.4. HIV’ in Mikrobiyolojik Özellikleri

HIV Retroviridae ailesinin lentivirüs alt ailesine ait 100-110 nm çapa sahip, sferik, koni şekilli nukleokapside sahip, lipitten oluşan iki tabakalı zarfla çevrilmiş bir RNA virüsüdür. Bu iki tabakalı lipitten oluşan zarf üzerinde gp120 ve gp41 adı verilen 2 glikoproteinden oluşan 72 adet çıkıntı şeklinde yapılar mevcuttur. Gp120 ve gp41 glikoproteinleri HIV’ in env geni tarafından kodlanmakta olan prekürsör protein olan gp160’ ın proteolitik olarak parçalanması ile oluşurlar. Transmembran glikoprotein olan gp41 iki katmandan oluşan lipid tabakası içinde; gp120 ise HIV’ in yüzeyinde ve gp41’ e bağlı şekilde bulunur ve görevi virüsün uygun yüzey reseptörleri olan konak hücreler ile bağlanmasını sağlamaktır (Şekil 5) (27, 28).

Viral glikoproteinler, env geni tarafından kodlanan poliprotein glikolizasyona uğraması, endoplazmik retikulum ve golgi aparatında işleme tabi tutulması yani proteolitik parçalanması ile oluşurlar. HIV’ in gp 160 glikoproteini gp41 ve gp120’ ye parçalanır. Bu glikoproteinler viriyonun yüzeyinde görülen lolipop benzeri trimer çıkıntılar oluştururlar. Büyük glikoprotein, hücre yüzey reseptörüne bağlandığı için virüsün doku tropizmini sağlar ve nötralizan antikorlar tarafından tanınır. Daha ufak alt ünite olan gp41 lolipopun sapını oluşturur ve hücre füzyonunu sağlar. gp120 aşırı glikozillenmiştir ve antijenik yapısı ve reseptör spesifikliği kronik HIV enfeksiyonu sırasında değişebilir(19).



Şekil 5 : HIV Şematik Görünümü

Enfeksiyonun erken evrelerinde viriyonun RNA genomu, revers transkripsiyon işlemi ile çift iplikli linear DNA şeklini alır. Bu işlem sırasında virüs tarafından kodlanan RT enzimi kullanılır. Bu linear viral DNA konak hücre genomuna provirüsü oluşturmak üzere entegre olur. Diğer retrovirüsler’ de olduğu gibi HIV hücre siklusunun hücre dışı fazında tek iplikli RNA (yani viriyon) ve hücre içinde çift iplikli DNA (provirüs) olmak üzere iki genomik forma sahiptir(3).

HIV-1 provirüsü, viral nükleik asidin konak hücreye entegre olan DNA formudur. 9.7 Kb uzunluğunda ve her iki ucunda ‘‘Long Terminal Repeat (LTR)’’ lerin sınırladığı viral proteinleri kodlayan yapısal *gag-pol-env* genlerinden oluşur. LTR dizileri farklı hücresel transkripsiyonel faktörlerinin bağlanmasında kullanılan promoter, enhancer ve diğer gen dizilerini içerir. 5’ ucu kor ve matriks proteinlerini kodlayan *gag* geni ile başlayıp; PR, RT ve IN’ i kodlayan *pol* geni ile transmembran ve zarf proteinlerini kodlayan *env* geni ile devam eder. Bir grup aksesuar gen, *pol* ve *env* gen dizileri arasında ve ikinci bir grup da virüsün 3’ ucunda yer alır(27).

Transkripsiyonel transaktivatör (*tat*) ve viral ekspresyonun reglatuvar (*rev*) genleri viriyon’ da bulunmayan ufak proteinleri kodlar ki bunlar viral replikasyon için gereklidir. HIV hücre kültüründe viral replikasyon için gerekli olmayan çeşitli genlere de sahiptir. Aksesuar genler dediğimiz bu genlerden *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef* HIV-I için ve *vif*, *vpx*, *vpr*, *nef* ise HIV-2 için spesifiktir. *vpr* ve *vpx* genlerinden oluşan proteinler viriyon

içinde toplanır. Oysa vif, vpu ve nef gen ürünleri viriyon içinde paketlenmez (27, 29, 30).

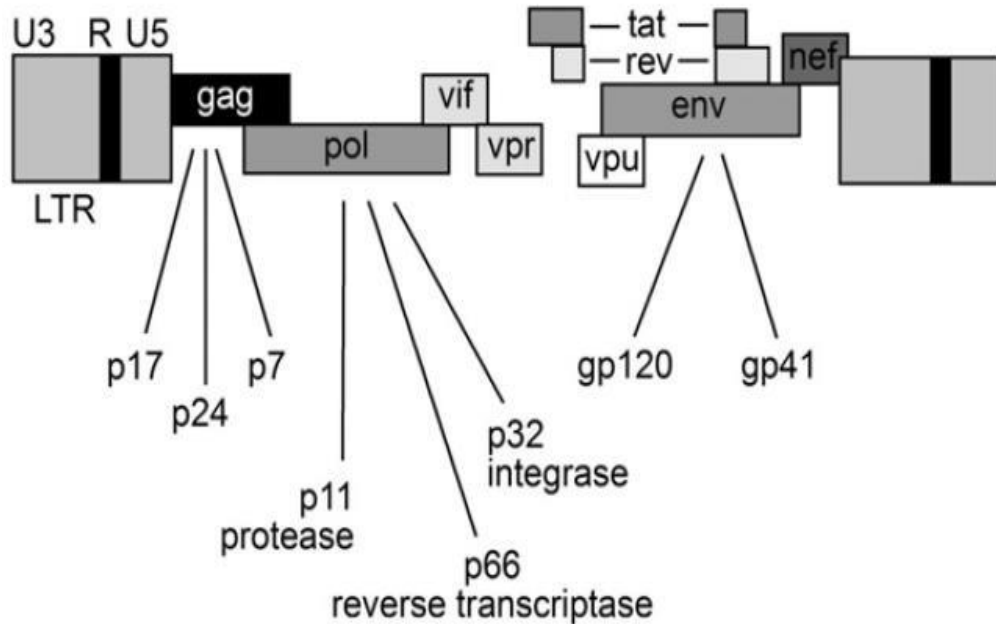
Vif viral enfektivite faktörüdür. Konak hücrede var olan inhibitör etkisi olan faktörlere karşı koyar. Vif cytidine deaminaz APOBEC ailesinin antiviral etkisini inaktive ederek ortadan kaldırır. APOBEC3G yeni keşfedilmiş endojen bir inhibitör faktörüdür. mRNA veya DNA' da ki özellikle sitosini urasile deamine eden hücre içi enzimler ailesi içinde yer almakta olup, viral DNA degradasyonuna yol açar. Vif APOBEC3G ile kompleks meydana getirip etkisini inhibe eder.

Vpr makrofaj hücreleri gibi bölünmeyen hücrelerde viral replikasyon için elzemdir. Makrofajların enfeksiyonunu hızlandırır. Vpr hücre siklusunu etkiler viral preintegral komplekslerin nukleusa geçişinde görevlidir. Ayrıca viral ve hücrel promotörlerin transkripsiyonunu aktive eder ve apoptoz ile ilişkisi vardır.

Tat transkripsiyonel aktivatördür. Tat hücre döngüsünü durdurur ve viral DNA transkripsiyonunu artırır. Viral transkriplerin elongasyonu için tat gereklidir.

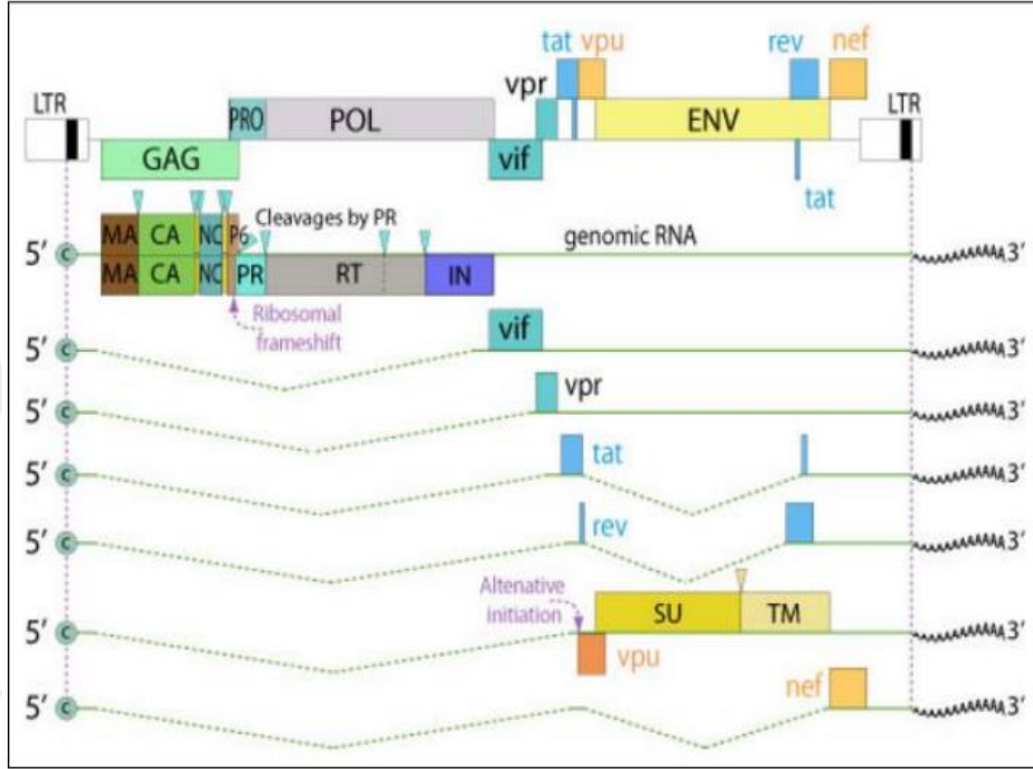
Rev viral gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alır.

Vpx nukleusa geçişten, vpu partikül salımını kolaylaştırmadan ve CD4 degradesyonundan sorumludur (Şekil 6-7).



Şekil 6: HIV -1 Genomik Yapısı (HIV 2010 Medizin Fokus Verlag, 2010; 23)

Nef, negatif efektör olarak bilinir ve hücrenin yüzeyinde CD4, MHC-I, MHC-II, CD3, CD25 ekspresyonlarının azalmasından, virüs enfektivitesinin şiddetinin artırılmasından, hücrel aktivasyon yollarının modülasyonunda görevlidir (31 ,32).



Şekil 7 : HIV Genomik Yapısı

2.5. Patogenez ve İmmünite

HIV' in oluşturduğu hastalıkta ve patogenezde ana belirleyici, CD4 eksprese eden T hücreleri ve makrofajlara karşı virüsün gösterdiği tropizimdir. HIV' in neden olduğu immüno-supresyon (AIDS), bağışıklık sisteminin yardımcı ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık fonksiyonu taşıyan CD4 T hücre sayısındaki azalmadan kaynaklanır (19).

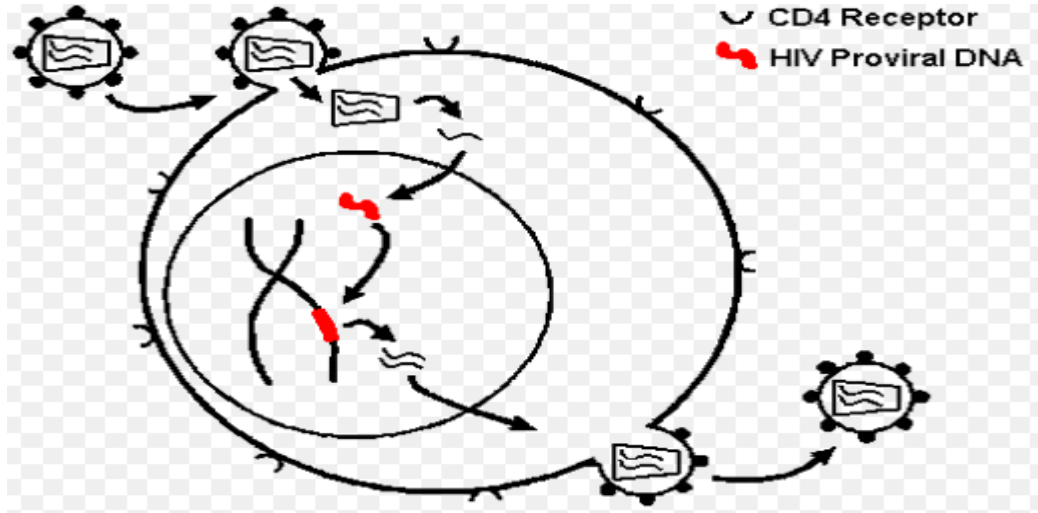
Konak hücrenin enfeksiyonu için viriyonun gp 120 proteininin konak hücre membranının yüzeyinde lokalize olan CD4 reseptörüne bağlanması gerekir. CD4 molekülü, T lenfositlerinin yüzeyinde bol miktarda, makrofajlar, dendritik hücreler ve diğer antijen sunan hücrelerin yüzeyinde daha az sayıda bulunur. CD4, kendini taşıyan

hücreleri enfeksiyona duyarlı hale getirdiği gösterilen ve bu fonksiyonun ilk olarak tanımlandığı reseptördür. HIV ayrıca, değişebilir miktarda CD4' ü eksprese eden veya saptanabilir CD4 ekspresyonu olmayan çok çeşitli hücre tiplerinde de saptanmıştır. Bu hücreler; megakaryositler, periferik kan dendritik hücreleri, foliküler dendritik hücreler, epidermal Langerhans hücreleri, astrositler, oligodendroglia ve mikroglialar, CD8+ hücreler, servikal hücreler, rektal mukozal hücreler, trofoblastik hücreler, renal epidelyal hücreler ve retinal hücrelerdir(29).

Lenfositler ve monositler üzerinde CD4 ile gp120 arasında ilk bağlanmadan sonra HIV-1' in hedef hücreye girişini ilerleten farklı koreseptörler de tanımlanmıştır. Bu reseptörler kemokin reseptörleri olup CCR5 ve CXCR4 olarak adlandırılır.

CCR5 sadece monosit ve makrofajlarda bulunurken, enfeksiyonun erken evrelerinde bulunan sinsiyum oluşturmeyen fenotipe sahip M (makrofaj) tropik virüslerle enfeksiyona olanak sağlar. CD4+ T hücrelerinde yer alan koreseptör ise CXCR4 olup, bu kemokin reseptörü ise sinsiyum oluşumundan sorumlu olan ve sadece T hücrelerine tropizm gösteren izolatları bağlar(3).

CCR5 reseptörü açısından yetersiz olan insanlar HIV ile enfeksiyona daha dirençlidir. CCR5 antiviral ilaçlar için hedef reseptördür. HIV CD4 T hücrelerinin enfeksiyonunu kolaylaştırmak için DH*SIGN denilen bir lektin molekülü aracılığıyla dendritik hücre yüzeyine bağlanır ve yüzeyinde kalır. Makrofajlar ve dendritik hücreler HIV ile persistan şekilde enfekte olurlar ve böylece ana rezervuar görevi görürler (Şekil 9). Bu şekilde de HIV' in yayılmasında ana araçdırlar. gp 120' yi kodlayan env geninde meydana gelen mutasyonla virüs tropizmi CCR5 (M tropik)' den CXCR4 (T tropik) virüse değişir. T-tropik virüsün gp-120' si C ve CXCR4 kemokin reseptörüne bağlanır. Bazı virüsler iki reseptörü de yani hem CCR5 hem de CXCR4' ü kullanır. CXCR4' ü tercih yönündeki reseptör değişimi geç oluşur ve hastalığın ilerlemesi ile korelasyon içerisindedir. CD4 T hücre sayısındaki azalma, direk olarak HIV ile indüklenen sitolizden, sitotoksik T hücrelerinin indüklediği immün sitolizden veya büyük miktardaki HIV antijenine karşı kronik aktivasyondan kaynaklanabilmektedir(3, 19, 33).



Şekil 8 : HIV Yaşam Döngüsü

CCR5 eksprese eden T hücrelerinin hedef alınması sonucu bağırsak ile ilişkili CD4 T hücre lenfoid dokusu azalır. AIDS semptomları' nın gelişmesi, kana artan miktarda virüs salınımı, T-tropik virüs sayısında artış, CD4 T hücrelerinde azalma, total T hücre sayısında (CD3 taşıyan hücreler) azalma ile ilişki gösterir(34).

HIV, enfekte T hücrelerini öldürebilen çeşitli sitopatolojik etkileri de indükler. Bunlar, viral genomun sirküler DNA kopyasının toplanması, plazma membranının permeabilitesinin artması, sinsityum oluşumu ve apitozun indüklenmesidir(19).

HIV'e karşı bağışık yanıt, viral enfeksiyonu sınırlar fakat aynı zamanda patogenezedeki katkıda bulunur. gp120' ye karşı oluşan nötralizan antikorlar antikora bağımlı hücrel sitotoksik yanıtı yol açar. Antikorla kaplı virüsler halen enfeksiyozdur ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. CD8 T hücreleri, HIV enfeksiyonu' nun ilerlemesinin kontrolünde kritik hücrelerdir. CD8 T hücreleri; enfekte hücreleri hem direk sitotoksik etki ile hem de virüsün koreseptörüne bağlanmasını bloke eden kemokinler gibi viral replikasyonu baskılayıcı faktörleri oluşturarak öldürebilirler.

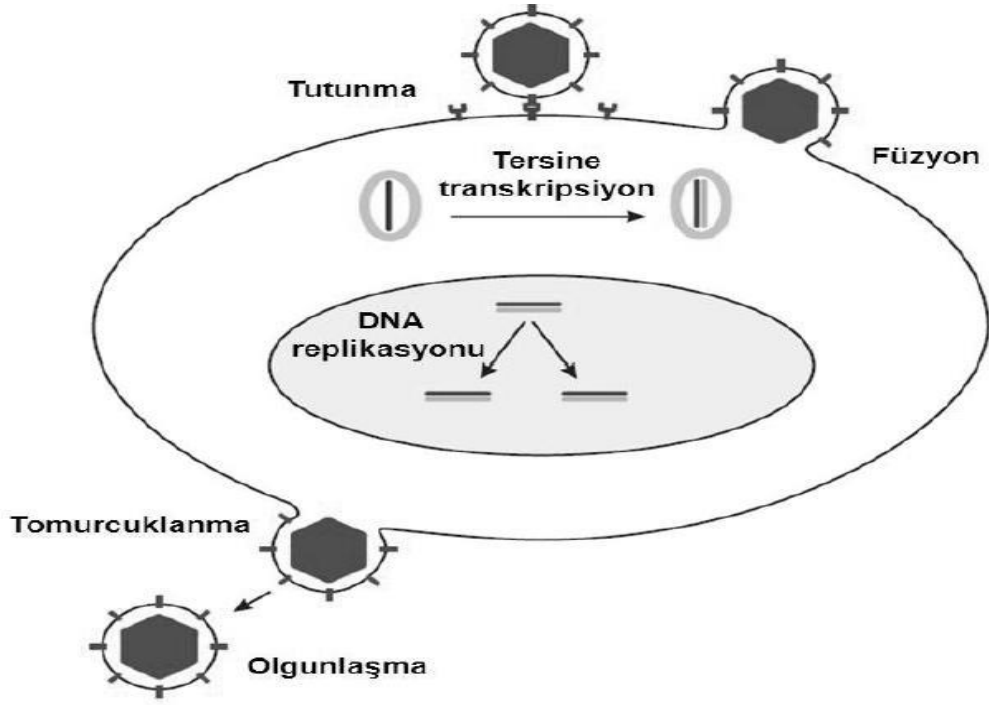
CD8 T hücrelerinin aktivasyonunun CD4 T hücreleri tarafından gerçekleştirilmesi şarttır. CD8 T hücreleri sayısal olarak CD4 T hücreleri ile birlikte azalma göstererek bireydeki AIDS tablosuna işaret ederler(35, 36).

HIV hastalığının seyri, CD4 hücre sayısındaki azalma ve kandaki virüs miktarı ile paralellik gösterir. Cinsel temasla bulaşı takiben HIV bağırsakla ilişkili lenfoid dokudaki CD4 T hücrelerini enfekte eder ve tüketir. Enfeksiyonun akut fazı sırasında plazmanın ml' sinde 10.000.000 partikül gibi patlama tarzında bir virüs üretimi söz

konusudur (Şekil 9). T hücre proliferasyonu ve enfekte lenfoid ve myeloid hücrelere yanıt, mononükleoz benzeri bir sendroma yol açar. Klinik latent dönemde kandaki virüs düzeyi düşüş gösterir, fakat lenf düğümlerinde viral replikasyon devam eder. Virüs makrofaj ve dinlenmekte olan T hücrelerinde de latent kalır. Hastalığın geç evresinde kandaki virüs düzeyi artar, CD4 düzeyleri anlamlı derecede düşer, CD8 hücre düzeyleri keza düşer, T-tropik virüsler artar, lenf düğümü yapısı harap olur, hastanın bağışıklık sistemi baskılanır. Makrofajların ve dendritik hücre'nin aktivasyonundan sorumlu CD4 T hücrelerinin kaybı, AIDS için karakteristik çok sayıda fırsatçı enfeksiyonun gelişmesine yol açar. CD4 T hücrelerinin sayılarındaki azalma ve CD8 T hücrelerini aktive edememelerinden ötürü, JC poliomavirüs, pregressif multifokal lökoensefalopati (PML), HSV, VZV, CMV enfeksiyonları, hatta EBV-ilişkili lenfoma ve HHV-8 ilişkili Kaposi sarkomu gibi latent enfeksiyonların tekrarlama potansiyeli artar(35, 36, 37).

İmmüsupresyona ek olarak, HIV ayrıca nörolojik anormalliklere de yol açar. Mikroglial hücreler ve makrofajlar, beyindeki HIV ile enfekte başlıca hücre tipleridir. Enfekte monositler ve mikroglial hücreler, beyinde enflamatuvar yanıt ve nöron ölümüne yol açacak nörotoksik maddeler ve kemotaktik maddeler salgırlar(37).

HIV enfeksiyonu patogeneğinde birtakım direk ve indirek olmayan bazı mekanizmaların varlığı kabul edilmiştir. Bu indirek mekanizmaların içinde apoptoz, süperantijen etkisi ve bağışık yanıtın meydana getirdiği harabiyet mevcuttur. Ancak HIV enfeksiyonu' nun immünopatolojisi büyük ihtimalle virüsün direk olarak CD4 hücrelerine etkilemesine bağlıdır. CD4+T lenfosit hücrelerinin bağışıklık sisteminde etkin ana bir görevi mevcuttur. Ayrıca bağışıklık sisteminde sitokin üretiminde meydana gelen düzensizlik gibi sekonder etkilerinde katkısı vardır. CD4 hücrelerinin düzeyinde azalmaya yol açan temel etken bizzat virüsün kendisidir(38, 39, 40) .



Şekil 9 : HIV Evrimi

2.6. HIV' in Hücresel Hedefleri ve Viral Replikasyon

HIV' in konak hücreye tutunması ve konak hücreye girmesi için virüs yüzeyindeki proteinler ile konak hücre yüzeyi proteinlerinin birbirlerine özgü olmaları gerekir. HIV zarf proteinleri olan gp120 (surface – SU) ve gp41 (transmembran-TM) için uygun reseptör CD4' tür. Bu CD4 molekülü T yardımcı hücrelerde, myeloid hücrelerden monositlerin, makrofajların ve dendritik hücrelerin yüzeylerinde bulunmaktadır.

HIV yüzeyinde bulunan zarf proteinlerinin; HIV ile konak hücre füzyonunun başlatılmasını sağlayabilmesi ve konak hücre sitoplazmasına girebilmeleri için reseptör moleküller ile etkileşim halinde olmalıdırlar. Kökeni farklı HIV virüslerinin hücre tropizmlerini bu koreseptör moleküller belirlemektedir. Alfa kemokin reseptörü CXCR4 T hücrelerinin birbirleri ile etkileşimlerini ve bunların sinsityum oluşturmalarını sağlar. CCR5 beta kemokin reseptörü ise M-tropik (monosit-makrofaj) HIV-I suşlarının enfeksiyonuna neden olur.

M tropik HIV izolatları sınırsız çoğalmazlar; fakat bir kısım M tropik HIV izolatları ise T hücrelerinin enfekte etme özelliğine sahiptirler(1, 3).

İnsan retrovirüslerin' den HIV' in replikasyonu, viral glikoprotein çıkıntılar olan gp120 ve gp41 trimerinin primer reseptör olan CD4 proteinine ve yardımcı reseptör olan transmembran G-proteinli kemokin reseptörüne bağlanması ile başlar. Yardımcı reseptör makrofajlarda, periferik veya diğer T hücrelerinde bulunan CCR5 yada primer olarak T hücrelerinde eksprese olan CXCR4 kemokin reseptörüdür. Az sayıda insan HIV ile enfeksiyona dirençlidir; çünkü bu insanların yardımcı reseptörleri olan CCR5 ve CXCR4 kemokin reseptörlerinde mutasyon vardır(20). CCR5 geninde homozigot delesyon içeren kişiler virüsle çok kez karşılaşmalarına rağmen enfeksiyona dirençlidirler. Bu delesyon için heterozigot olan bazı enfekte kişiler ise, uzun süre AIDS aşamasına gelmedikleri tespit edilmiştir (14). Kemokin reseptörüne bağlanma, viral zarf ve hücre plazma membranını birbirine yakınlaştırır ve gp41' in etkili olmasını ve iki membranın füzyonunu kolaylaştırır (20). HIV ayrıca bağırsakla ilişkili lenfoid dokudaki hücrel bir adezyon molekülü olan integrin alfa4beta7' ye bağlanır(1).

Virüs genomu sitoplazmaya salınıncaya replikasyonun erken fazı başlar. pol geni tarafından kodlanan revers transkriptaz viriyondaki t-RNA' ları primer olarak kullanır ve tamamlayıcı, negatif iplikli DNA (cDNA) sentezlenir. Revers transkriptaz enzimi ribonukleaz H gibi davranarak bu davranışı ile RNA genomunu parçalayarak ardından pozitif DNA ipliğinin sentezini gerçekleştirir. Viriyon DNA' sının (provirüs) sentezi sırasında, genomun her iki ucundan (U3 ve U5) diziler duplike edilir, böylece LTR' ler iki uca da eklenir. Bu işlemle, entegrasyon ve transkripsiyonun regülasyonu için gerekli olan LTR içindeki hızlandırıcı ve promotör dizileri oluşturulur. Revers transkriptaz hataya çok açıktır. HIV in bu genetik değişkenliği bir hastanın enfeksiyonu sırasında yeni virüs suşlarına yol açar. Buda virüsün patojenitesine değiştirebilir ve bağışık yanıtta kaçışına yol açabilir(37).

Çift iplikli DNA nükleusa aktarılır ve virüs tarafından kodlanan, viriyonda yer alan entegraz enzimi ile konak kromozomuna katılır. Entegrasyon hücre aktivitesini gerektirir, ama HIV cDNA' sı nükleus ve sitoplazmada entegre olmamış sirküler DNA olarak hücre aktive olana kadar kalabilirler. Entegre olduktan sonra geç faz başlar ve viral DNA (provirüs), konak hücreye ait RNA polimeraz II enzim aktivitesi ve hücrel genler eşliğinde transkripsiyona uğrar ve RNA' yı meydana getirir. Bu sistem retrovirüslerde farklı m-RNA oluşumları için işler ve gag, gag-pol ya da env genlerine ait dizileri ihtiva ederler. Provirüs hücrel gen gibi hareket eder ve bu nedenle

replikasyonu, viral DNA' nın metilasyon derecesine, hücre üreme hızına, en çokta hücrenin LTR kısımlarında kodlanan enhancer ve promotör bölgelerini tanıma yeteneğine dayanır. Bir hücrenin retroviral genomu genomu transkribe edebilme yeteneği bir retrovirüs için konağı ve doku tropizmini belirleyen ana determinanttır. HIV replikasyonu altı kadar aksesuar gen ile regüle edilir(3).

tat geni viral ve hücrel genlerin transkripsiyonu için transaktivatördür. rev proteini viral mRNA' nın sitoplazma içine transportunu regüle ve stimüle eder (3) .

nef proteini hücre yüzeyinden CD4 ve majör histokompatibilite sınıf I (MHC I) moleküllerinin ekspresyonunu azaltır, T-hücre sinyalizasyon yollarını değiştirir, virüsün sitotoksitesini regüle eder ve yüksek viral yük için gereklidir. Nef proteini, enfeksiyonun AIDS' e ilerlemesi için gereklidir(3).

vif; toplanmayı ve olgunlaşmayı indükler ve antiviral hücrel bir proteine (APOBEC-3G) bağlanarak, cDNA' nın hipermutasyona uğramasına engel olur ve virüsün myeloid ve diğer hücrelerde çoğalmasına yardım eder(3).

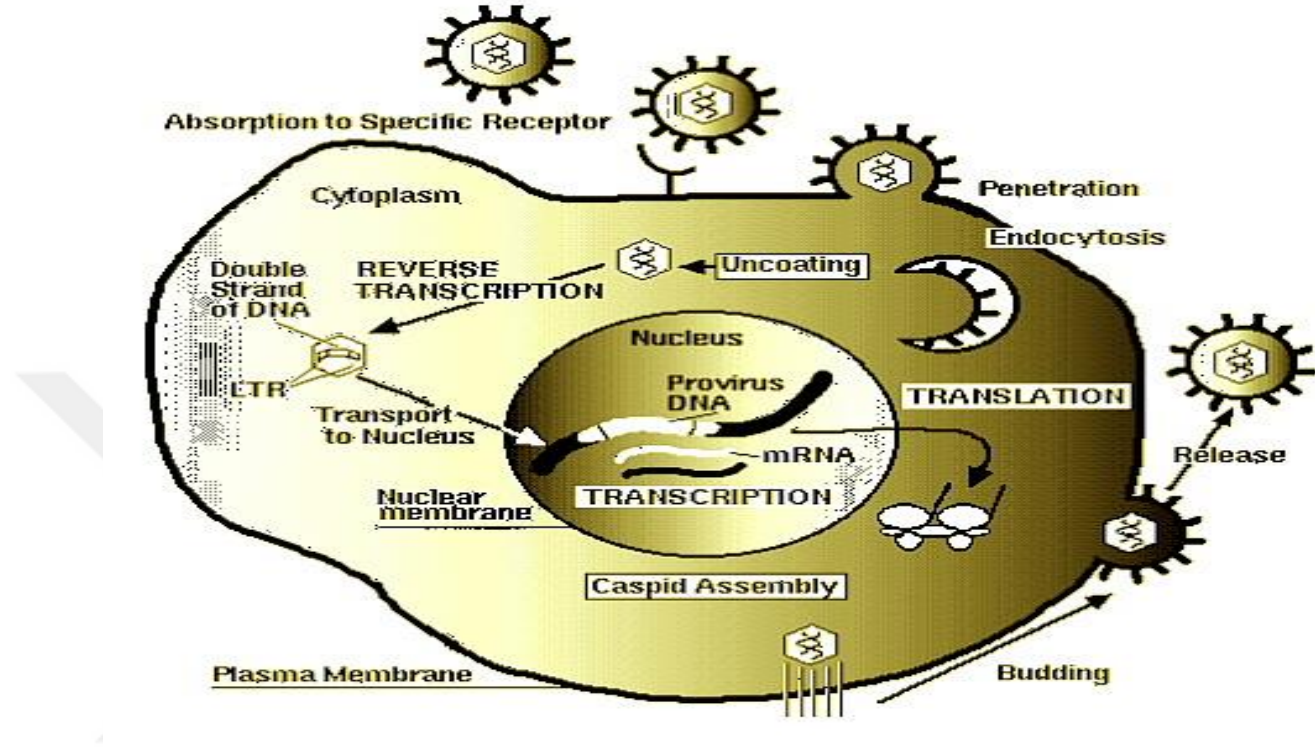
vpr hücre yüzeyinin CD4 ekspresyonunu azaltır ve viriyon salınımını artırır.

Vpr (HIV-2 de vpx) cDNA' nın nükleus içine transportunda önemlidir ve ayrıca makrofajlar gibi büyümeyen hücrelerde virüs replikasyonu için önemlidir. vpr; hücreleri büyüme siklusunun G2 fazında tutar, bu HIV replikasyonu için optimal durumdur. Hücre HIV replikasyonunu kontrol eder ve T hücrelerinin sitokin, mitojen yada antijen ile aktivasyonunda virüs replikasyonunu stimüle eder.

Gag, gag-pol ve env mRNA' lardan okunan proteinler, poliprotein olarak sentezlenirler ve sonunda fonksiyonel proteinlere parçalanırlar. Önce viral glikoproteinler sentezlenir daha sonrada glikozilasyona uğrar, endoplazmik retikulum ve golgi aparatında işleme tabi tutulurlar. Bu glikoproteinler membrana tutunur ve viral ataçman proteininin hücre dışı alt ünitelerine parçalanırlar ve trimer oluşturup plazma membranına geç ederler. gag ve gag-pol poliproteinleri asilasyona uğrar ve sonra zarf glikoproteinini taşıyan plazma membranına bağlanırlar. Genomun iki kopyası ile hücrel transfer RNA molekülleri viriyonun tomurcuklanmasını stimüle eder. Zarf ile kaplanma ve hücreden salınmadan sonra viral proteaz, gag ve gag-pol poliproteinlerini parçalar ve revers transkriptaz salınır, viriyon özü oluşur. Enfeksiyöz viriyonun oluşması için bu proteaz aşaması gereklidir ve bu aşama antiviral ilaçların başlıca hedefidir (3).

Zarfla kaplanma ve retrovirüs salınımı hücre yüzeyinde olur. HIV zarfı, MHV molekülleri de dahil hücrel proteinleri içerir. Retrovirüs replikasyonu ve tomurcuklanma sonucunda hücrenin ölmesi şart değildir. HIV bir hücreden diğerine çok

nükleuslu dev hücreler ve sinsiyum oluşturarakta yayılır (Şekil 10). Sinsityumlar frajildir ve oluşmaları virüsün sitolitik aktivite sini arttırır(3).



Şekil 10 : HIV Yaşam Döngüsü

2.7. HIV Tanısı

HIV enfeksiyonunun zamanında tanısı antiretroviral tedavi ve fırsatçı hastalıkların profilaksisi, korunma ve enfeksiyon kontrolü için önemlidir. HIV ile enfekte kişilerin immünolojik ve virolojik laboratuvar değerlendirmeleri şarttır.

HIV ile enfeksiyonun laboratuvar tanısında kullanılan testlerini dört gruba toplayabiliriz :

- 1- HIV' e karşı özgül antikorların tespit edilmesi ve gösterilmesi
- 2- HIV antijen tayini
- 3- Hücre kültüründe virüsün izolasyonu

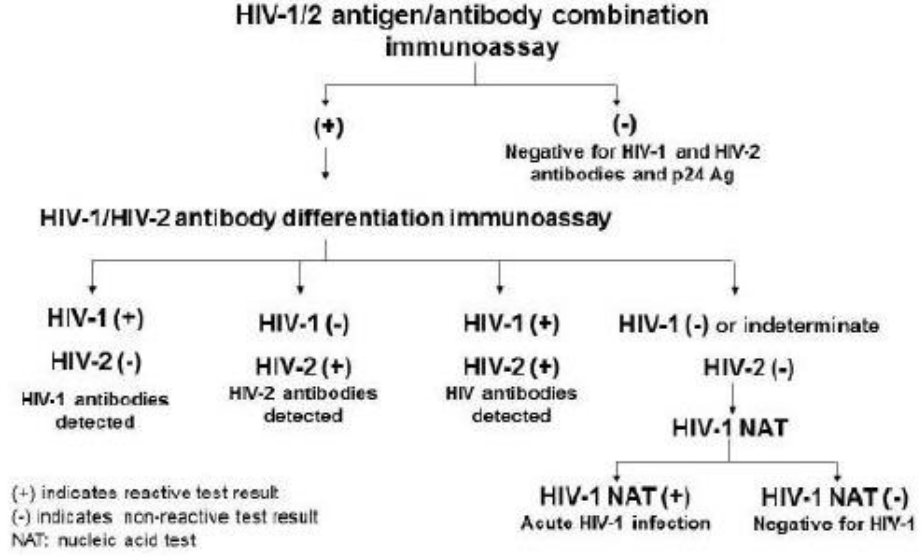
4- HIV nükleik asit molekülünün gösterilmesi

HIV ile enfeksiyonun tanısında öncelik özgül antikor varlığının gösterilmesidir. Ancak bazı özel durumlarda nükleik asidin gösterilmesine dayanan moleküler yöntemlere gereksinim olmaktadır. Günümüzde halen HIV enfeksiyonunun tanısı 18 aydan büyük bireylerde ve yetişkinlerde virüse özgü antikorların gösterilmesi ile koyulmaktadır ve bu virüse özgü antikor HIV ile enfekte olmuş tüm bireylerde bulunmaktadır. Enfeksiyonu takiben antikorlar 2 hafta sonra serumda saptanabilmekle birlikte bu süre 2-3 ayı bulabilir. HIV ile enfekte olduktan sonra 6 hafta da enfekte kişilerin %80' inde serokonversiyon saptanırken, 12 haftalık süreçte enfekte bireylerin tamamının serumlarında HIV antikorları tespit edilir (Şekil 11). Bu süreler kişilerin bağışıklık yetersizliği durumlarına göre değişiklik gösterir(52).

HIV ile enfekte olmuş kişilerde virüse özgü antikorların gösterilmesi için kullanılan indirek tanı yöntemlerinden farklı olarak virüsün direk olarak tespit edilip gösterildiği nükleik asit tasi (NAT) pratik olması, zaman kazandırması ve duyarlılığı sebebi ile tercih edilmektedir. Bu nükleik asit testleri ile HIV' in hem kantitatif hemde kalitatif tayini mümkündür(53).

Kantitatif Viral genom tayini ile HIV genomunun miktarı (HIV viral yükü) başka bir deyişle HIV RNA' sının plazmadaki konsantrasyonu ölçülmektedir. Viral yükü tespit ettiğimiz bu testler antiretroviral tedaviye yön vermektedir. HIV RNA' sının kantitatif olarak tayin edilmesi prognostik belirteç olarak, tedavinin şekillendirilmesinde ve bireyin enfeksiyöz olma derecesini belirlemede kullanılmaktadır.

Kalitatif HIV DNA tespiti, erken dönemde antikor oluşumunun olmadığı ya da düşük düzeylerde olduğu durumlarda, antikor testleri ile kesin sonuç alınamayan primer enfeksiyonlarda, maternal antikor varlığı nedeni ile antikor testleri ile sonuç alınamayan HIV ile enfekte anneden doğanlarda tanı koymak amacı ile kullanılır(52, 53).



Şekil 11 : Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention = CDC) ‘nin önerdiği HIV tanısında izlenecek algoritma (48)

HIV enfeksiyonu tanısında öneriler, farklı ülkelerde enfeksiyon prevalansına ve koşullara göre özellik göstermektedir. Tanı sıklıkla iki pozitif tarama testi sonrası, doğrulama testi ile konulur. Tarama testleri ile şüpheli serumdaki virüse özgü antikorların tespiti yapılırken, doğrulama testleriyle ise tarama testleri ile reaktif bulunan serumların net olarak HIV antikorlu bakımından tespitini gerçekleştirir. Tarama testleri ile antikor saptanıp sonuç pozitif bulunduğunda bu sonuç ‘reaktif’ olarak, doğrulama testleri ile elde edilen pozitif sonuç ise ‘pozitif’ olarak adlandırılır.

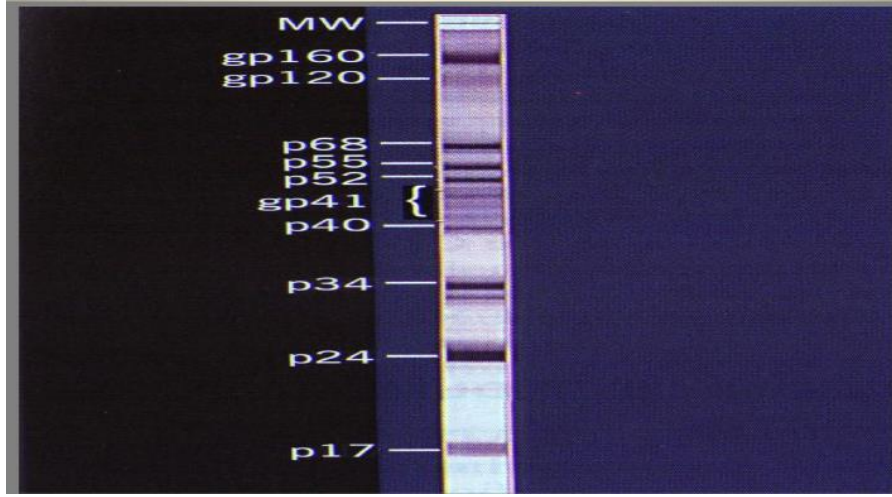
Uygulanan tarama testleri Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA/EIA), aglütinasyon testleri ve dot blot immunobinding assay‘ dir. ELISA testi çok sayıda numune incelenmesine olanak vermesi, özgüllük ve duyarlılığının yüksek olması günümüzde ilk basamak testi olarak kullanılmasına neden olmuştur. Tarama testlerinin sonuçları uyumsuz ve/ veya destekleme testi belirsiz ya da negatif ise kişinin ayrıntılı öyküsü ve klinik ile enfeksiyon olasılığı değerlendirilir. İnfeksiyon riski yakın geçmişte ise dikkatli izlem gerekir. Belirsiz sonuçların genellikle bir ayda pozitifleşmesi beklenir (Şekil 13).

Doğrulama testleri arasında Western blot (WB), Immunofloresan Assay (IFA) ve Radioimmünopresipitasyon (RIPA) yer alır. Ülkemiz dahil en sık kullanılan doğrulama testi WB’ dir. WB ile HIV virüsünün tüm yapı proteinlerine karşı oluşmuş

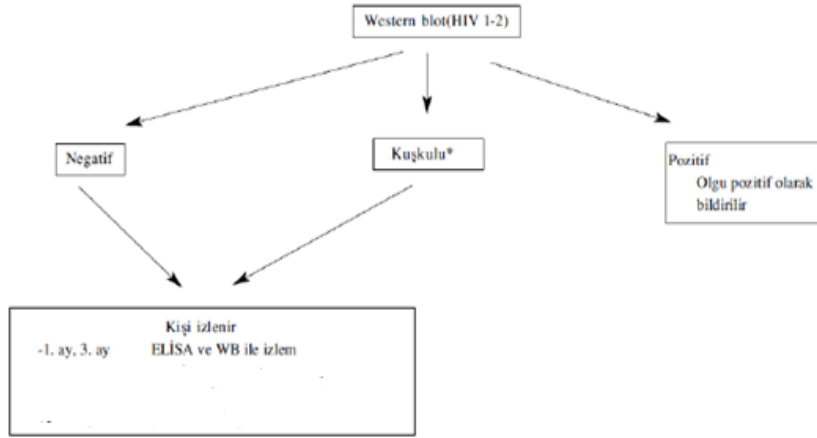
antikorlar ayrı ayrı saptanmaktadır. WB ile pozitifliği doğrulanan sonuçta gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17, p15 yapısal proteinlerinin bulunduğu tüm bölgelerde nitroselüloz şerit üzerinde bantlar oluşur (Şekil 12). Ancak daha önce sonuçlarından şüphelenilmeyen, her zaman sonuçlarının kesin olduğu bilinen WB ile de kesin olmayan sonuçların alınabileceği saptanmıştır(51, 52, 53).

WB dezavantajlarından dolayı artık Dünya çapında ve ülkemizde Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi' nin (Centers for Disease Control and Prevention = CDC) önerdiği yeni bir algoritma benimsenmeye başlanmıştır. Benimsenen bu algoritma başta ülkemizde doğrulama prosedürlerinin zaman almasından kaynaklı HIV enfekte bireylerin tedavilerinin gecikmesinin ve yaşam kalitelerinin olumsuz yönde etkilenmesinin önüne geçilmektedir. Bu algoritmaya dahil olan nükleik asit testleri ile bireylerin HIV/AIDS durumları daha hızlı ve daha güvenilir sonuçlanmaktadır (Şekil 11).

Çelik ve arkadaşları 2015 yılında 102 tekrarlayan sonucu reaktif ve WB ile doğrulanmış HIV/AIDS pozitif örnek ile duyarlılık, özgüllük ve pozitif prediktif değer tayini için yaptıkları çalışma ile WB testinin mevcut algoritmadan çıkarılması gerektiğini ve ikinci aşamada uygun hızlı test kullanılması gerektiğini göstermişlerdir (Şekil 15). Ayrıca 2015 yılında İstanbulda yapılan 1. HIV/AIDS çalıştayında da Türkiye için algoritmada ki aksaklıklar, izlenmesi gereken yollar ve yapılması elzem olan değişimler geniş kapsamlı katılım kitlesi ile masaya yatırılmıştır. Yapılan 1. HIV/AIDS çalıştay ile ulusal algoritmada ki WB basamağının uygulamadan kaldırılması, ikinci aşamada uygun hızlı test kullanılması ve HIV/AIDS 'in D grubu bildirim zorunlu hastalıklar grubuna girmesi kararları alınmıştır(48).



Şekil 12: Western blot sonucu (48)



Şekil 13: Western Blot'da İzlenecek Algoritma (48)

Algoritmada uygun hızlı testin 2. aşamada önerilmesi amacı ile

Çalışma devam ediyor: 102 seum

WB	Hızlı test	
81 pozitif:	78 pozitif (3 negatif)	
9 negatif :	9negatif	
6 düşük EIA absorbens	Indetermine-Kuşkulu	negatif
2 yüksek EIA absorbens	Kuşkulu	negatif
2 yüksek EIA absorbens	Kuşkulu	pozitif
1 yüksek EIA absorbens	Negatif	pozitif
1 düşük EIA absorbens	Negatif	pozitif

Şekil 14 : CDC Tarafından Önerilen Algoritma için Yapılan Çalışmalar (48)

Akut HIV-1 enfeksiyonu' nun tanısı; klinik kuşku olduğunda anti-HIV1/2 testi ile beraber HIV -RNA yapılmalıdır. Antikor testleri negatif, HIV-RNA testi pozitif, >5000 RNA bulunduğunda akut HIV-1 enfeksiyonu tanısı konur. Akut HIV-1 enfeksiyonu izlenerek anti-HIV serokonversiyonu saptanır. Akut HIV-1 enfeksiyonun da viremi düzeyi yüksek olduğundan duyarlılık %100 kabul edilmektedir. Özgüllük % 95-98 olarak bildirilmekle beraber, yalancı pozitif sonuçlar 2000 RNA kopyası / ml'' den düşük, yani akut enfeksiyonda beklenen değer çok altındadır. HIV enfeksiyonu ile antikor testlerinin pozitifleşmesi arasındaki süre ortalama üç haftadır. Primer HIV enfeksiyonunda önce 1-4 hafta süren lokalize virus replikasyonu olur. Bu dönem ender olarak aylarca uzayabilir(53,54).

Sistemik virus replikasyonunun başlayıp yüksek düzeyde artmasından önce düşük düzeylerde viremi oynamaları olur. Bu aralıklı düşük düzey viremi dönemi 25 güne kadar uzayabilir. Ve plazmadaki virus konsantrasyonu' nun 1-10 kopya/ ml olduğu tahmin edilir. Bu durumun mukoza ve lenfoid dokudan kana düşük düzeyde HIV sızmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu dönemde tranfüzyon için alınan plazma enfeksiyöz olabilir ve tarama testleri ile enfeksiyon saptanamaz(52, 53, 54).

Virusun hızla çoğalmaya başladığı dönem 100 kopya/ml ile başlar ve kısa sürede 100.000.000 kopya/ml düzeyine ulaşır. Virus replikasyonunun yükseldiği dönemde 1-5 gün sadece HIV-RNA pozitifdir; ardından virus yükü 10.000 kopya/ml olunca p24 antijeni saptanabilir. Virus yükü tepe noktaya ulaştıktan sonra azalmaya başlar ve denge noktasına (set point) gelir. Bu dönemde antikor testleri ve destekleyici doğrulama testleri pozitifleşir; ancak immun komplekslerin oluşması ile p24 antijeni saptanamaz duruma gelir(54).

Virus replikasyonunun yükseldiği dönemde immun yanıt da olmadığı için bulaştırıcılık çok yüksektir. HIV enfeksiyonu'nun tanısı, enfeksiyondan korunma ve hastanın prognozu yönünden önemlidir(54).

2.8. HIV Tedavisi

HIV enfeksiyonunun zamanında tanısı antiretroviral tedavi ve fırsatçı hastalıkların profilaksisi, korunma ve enfeksiyon kontrolü için önemlidir. HIV replikasyonunun dinamiklerinin ve ilaçlara direnç gelişim mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ile birlikte HIV enfeksiyonunun tedavisinde tekli ilaç kullanımı yerini kombine ilaç kullanımına bırakmıştır.

1995 yılından bu yana sayı olarak sürekli artış gösteren hastalara ‘‘Highly active Antiretroviral Therapy (HAART)’’ uygulanmaktadır ve bu şekilde HIV ile enfekte kişilerin yaşam süreleri ile yaşam kaliteleri artmıştır. Bu tedavi yönteminde düşük viral yük, stabil CD4 hücre sayısı ile birlikte komplikasyonlarda çok dikkat çekici bir azalma olmuştur(52).

Tedavi de kullanılan onaylanmış ilaçlar dört sınıfa ayrılır: nükleozid RT inhibitörleri (NRTIs), nonnükleozid RT inhibitörleri (NNRTIs), proteaz inhibitörleri (PI) ve füzyon inhibitörleri. HIV-1 tedavisinde uygulanan tüm ilaçlar HIV-2 üzerinde etkili değildir. HIV-2 NNRTIs' a direnç gösterirken, zidovudine ve bazı PIs' lara daha az duyarlılık gösterir(49, 52).

HIV enfeksiyonun da uygulanan antiretroviral tedavinin hedefi enfekte bireyin yaşam kalitesini arttırmak, HIV ile ilişkili mortalite ve morbidite oranını indirmek ve ayrıca temel olarak HIV viral yükünü uzun süre baskılamak ve bu düzeyde tutabilmektir (Şekil 14).

Enfeksiyöz HIV virüs partikülleri dolaşımdan kaybolmasına karşın, lenfoid dokulardaki HIV replikasyonu devam eder. Bu nedenle, HIV latent döneme hiç girmez,

hastalığın tüm dönemlerinde sürekli replike olarak, kronik aktif bir enfeksiyon oluşturur.

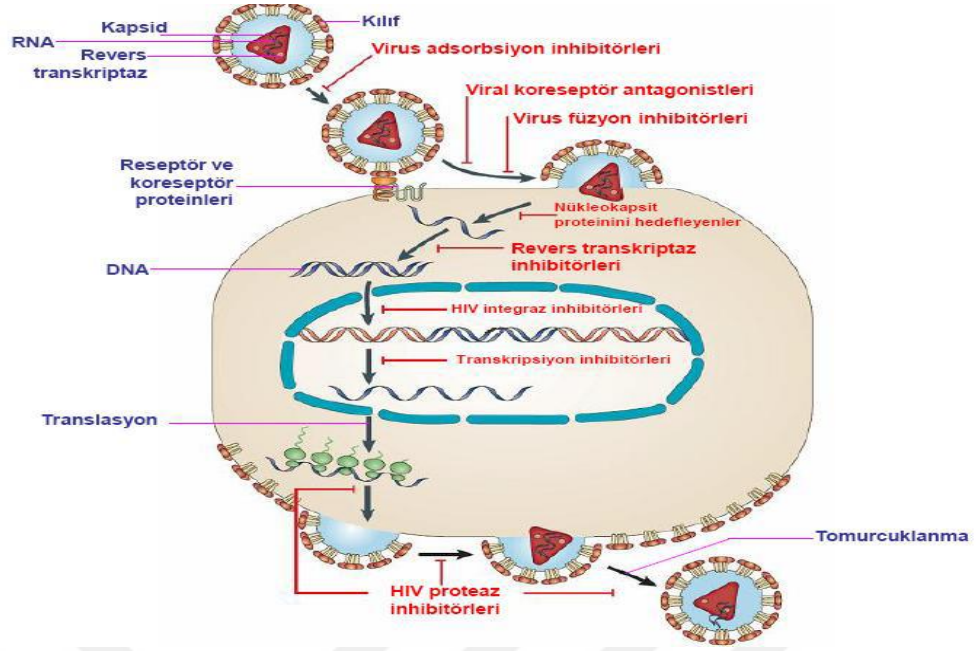
HIV enfeksiyonu sırasında sürekli lenfoid dokularda virüs replike olur ve immün sistem tarafından temizlenir. Yapılan çalışmalarda, HIV' in plazma yarı ömrünün 6–48 saat olduğu ve enfekte bir kişide günde 108-1010 virüs partikülünün üretildiği ve temizlendiği gösterilmiştir(55).

HIV replikasyonunda rol alan revers transkriptaz enzimi, her replikasyon döngüsünde yaklaşık 3×10^{-5} sıklıkta hata yapmakta ve yaptığı hatayı düzeltememektedir. Her replikasyon sırasında viral genomda en az bir mutasyon ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonlardan bazıları virüs açısından etkisiz ya da replikatif yönden defektif viral partiküllerin oluşumuna yol açarak zararlı olabilirken, bazıları da immün yanıt ya da antiretroviral ilaç gibi seçici baskılar karşısında mutant virusa replikatif avantaj sağlayabilmektedir. Önceden hiç antiretroviral tedavi almamış hastalardan izole edilen moleküler HIV klonların da, nükleozid ve non-nükleozid revers transkriptaz inhibitörlerine direnç neden olan mutasyonlara rastlanmıştır. Tedavide kullanılan antiretroviral ilaçların bir kısmı HIV revers transkriptaz enziminin hata yapma oranını arttırmaktadır(49).

HIV enfekte bireye ait genetik mutasyonlar, polimorfizmler plazmada var olan antiretroviral düzeylerinden sorumludur. Bu detaylar antiretroviral tedavinin güvenliği, etkinliği ve en önemlisi uyumu için çok önemlidir(56).

HIV replikasyonunun kapasitesi, konak hücre varlığının yeterli olduğu koşullarda ve herhangi bir inhibe edici unsur olmadığı durumlarda virüsün replike olma kapasitesidir. Buna karşın “viral fitness” doğal fenotipteki HIV izolatlarının uygun olmayan, konak hücre miktarının kısıtlı olduğu, immün sistemin ve farmakolojik etkenlerin baskısının hissedilir derecede olduğu ortamlarda replike olabilme kapasitesini gösterir(3).

Seropozitif bireyler arasındaki birbirlerine bulaşın önlenmesi farmakolojik ajanlara karşı direnç gelişiminin önüne geçilmesi açısından son derece önemlidir. HIV ile enfekte bireylerde mevcut HIV izolatlarının dirençli izolatlara dönüşmesi viral yükte belirgin artış, CD4 seviyesinin hissedilebilir şekilde düşüşü şeklinde bir tablo ile karşımıza(2).



Şekil 15: Antivirallerin HIV'e Etki Mekanizması (De Clercq E: 2004)

2.9. Koruma ve Kontrol

HIV ile enfeksiyonun yayılmasının önlenmesinde bireylere HIV' in bulaş yolları ve virüsün yayılımına engel olacak önlemler hakkında verilecek olan eğitimler önem taşımaktadır. Tek eşlilik, güvenli seks, kondom kullanımı HIV ile karşılaşma olasılığını önemli ölçüde azaltacaktır. Ayrıca damar içi uyuşturucu madde kullananlarda kontamine iğne ve ortak iğne kullanımı ana bulaş yollarından birini oluşturmaktadır (52).

HAART' ın ne kadar süreyle uygulanması gerektiği hakkında belirsizlikler mevcutken, yüksek maliyetli oluşu ve gelişmiş ülkelerde sadece belirli bir kesime uygulanabilmesinden dolayı bir çok HIV ile enfekte birey bu uygulamadan faydalanamamaktadır (42). Halen HIV' e karşı bir aşı geliştirilememiştir, bu yüzden enfeksiyonun önlenmesi ve kontrol edilmesi virüs bulaşının kontrolüne bağlıdır. Kontrol, korunma danışmanlığı ve temas sonrası profilaksiyi kapsamaktadır. Kabul edilmiş risk faktörlerini hedefleyen sürekliliği olacak özgül bilgilendirme ile birlikte destekleyici, ayrıştırmayan ve yargılamayan eğitimler en etkili yoldur(14).

Damar içi uyuşturucu madde kullanıcıları rehabilitasyon programlarına katılmaya özendirilerek ikna edilmelidir. Uyuşturucu madde kullanımının kesilmesi bazı davranış değişikliklerine neden olacağından olası HIV bulaş riskini azaltacaktır (52).

Güvenli seks eğitimleri, tanıtımları önleme danışmanlığının temel parçası olmalıdır. Bu uygulamalar sürekli kondom kullanımının teşvik edilmesi ve çok eşliliğin tercih edilmemesini sağlamalıdır. Cinsel yolla bulaşan hastalıkların taranması ve tedavi edilmesi uygulamaları HIV' in cinsel yolla bulaş riskini azaltacaktır.

Danışmanlık, tüm bu hedeflerin yanında doğum kontrol meselelerini ve enfekte anneden bebeğine virüs geçişini önlemeye yönelik hedefleri, önlemleri içermelidir. Tüm HIV ile enfekte gebelerin bebeklerine virüs geçirmelerini önlemek için antiretroviral tedavi almaları şarttır. HIV ile enfekte anneler aynı zamanda anne sütü yolu ile olması mümkün HIV bulaş hakkında bilgilendirilmeli ve diğer bebek besleme seçenekleri hakkında eğitilmelidirler.

Mesleki temasların ve bulaşların önlenmesi için, eğitimler ve küresel anlamda engelleyici ve önleyici uygulamalar; enfekte vücut sıvılarına maruz kalma olasılığını en aza indireyecek kontamine materyallerin güvenli bir şekilde atılması ve imha edilmesini sağlayacak cihazlar, yönetmeliklerin desteklenmesi şarttır. Kontamine vücut sıvıları ile mesleksel temas sonrasında, antiviral ilaçlar ile temas sonrası profilaksisi genel olarak kabul görmüş ve birçok sağlık kuruluşu tarafından özel tedavi protokolleri hayata geçirilmiştir.

Danışmanlık ve enfeksiyonun yayılma riskini azaltma programlarının uygulanması HIV bulaşının önüne geçilmesinde temel dayanak olmalıdır(52, 57, 58).

2.10. Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri

Nükleik asit çoğaltma ve saptama yöntemleri genel olarak iki kategoride incelenmektedir.

1. Nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri

2. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri

Moleküler yöntemlerin en eski ve basit yöntemlerinden biri nükleik asit hibridizasyon yöntemleridir ve kalıp hedef nükleik asit dizilerinin komplementeri işaretlenmiş problemlerle hibritlenerek tespit edilmekte ve tanı konmaktadır. Komplementer dizimizde kullandığımız bu problemlerin boyutları genelde 20--30 nükleotid uzunluğunda

olup çoğu zaman dedektör bir molekülle işaretlenen in vitro ortamda sentezi gerçekleştirilen oligonükleotid dizileridirler.

Nükleik asit kimyası kalıp zincirin komplementerini meydana getirme teknolojisine dayanır. DNA molekülü belirli bir ısı derecesine getirildiğinde çift iplikli yapısı sağlayan hidrojen bağlarında bozulmalar, kopmalar meydana gelir ve denatürasyon gerçekleşerek yapı tek iplikli haline gelir. Ardında ısı düşürülüp ortam soğumaya bırakıldığında ise komplementer baz çiftleri arasında yeniden hidrojen bağları oluşmaya başlar ve birbirinin tamamlayıcısı olan bazlar birleşerek renatürasyon gerçekleşerek tekrar çift iplikli yapı oluşur. Problar tek zincirli DNA veya RNA dizilei olup, hedef bölgedeki DNA veya RNA zincirlerinin komplementeridirler. Problar uygun ortam koşullarında yani uygun ısı, tuz, pH da kalıp DNA ya da RNA zincirine bağlanarak radyoaktif sinyaller ile tanı koymamıza yardımcı olur(59).

Birçok mikroorganizmanın kültür koşullarında üretilmesi veya identifikasyonu oldukça zordur; fakat bu mikroorganizmaların genomik yapılarının prob hibridizasyon yöntemi ile tespit edilmesi bunların identifikasyonuna olanak sağlar. Ancak hibridizasyon prob yöntemi; tek seferde sınırlı miktarda patojen ile işlem yapılabilir olması, yaygın olmayan patojenler ile işlem yapılacağında bunların öncelikle ön kültür ve duyarlılık testlerinin yapılması gerekliliği, sonuçlarda yanlış pozitif ve yanlış negatiflikler ile sık karşılaşma oranının olması tercih edilen bir yöntem olma oranını düşürmektedir.

Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ise son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde en sık kullanılan 3 farklı yöntem vardır:

- Hedef (target) amplifikasyon yöntemleri
- Probe amplifikasyon yöntemleri
- Sinyal amplifikasyon yöntemleri

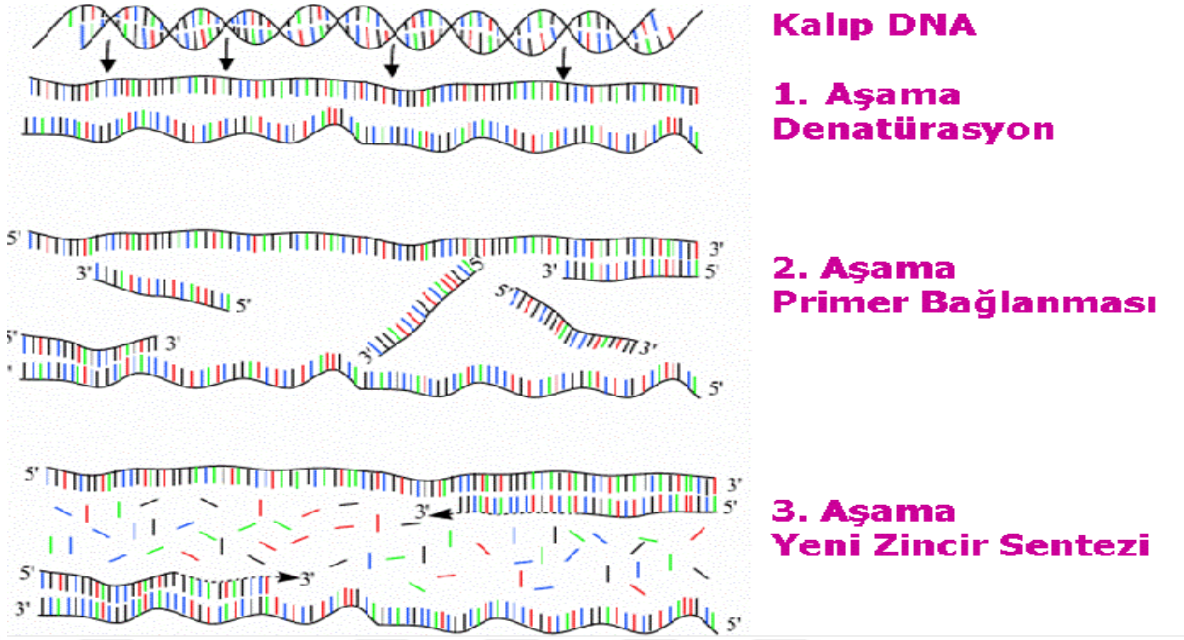
Amplifikasyon yöntemleri arasında genel olarak en kullanılan olanı ve en önemlisi “Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)” dur. PZR bakteriyel, fungal, viral ve protozoal hastalık etkenlerinin tanısında, moleküler biyoloji ve biyomedikal araştırmalarda, su, yiyecek ve gıdalarda bulunan mikroorganizmaların tesbitinde, genetik bozuklukların tanısında, prenatal tanıda, kanser taramalarında, adli tıp’ da suçlu teşhisinde, cinsiyet belirlemede, antropolojide, gen tedavisi ve DNA aşlarında olmak üzere çok geniş bir kullanım alanına sahiptir(59, 60).

2.10.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR, spesifik DNA segmentlerinin vitro amplifikasyonudur. Hedef DNA bir tüpte in vivo DNA replikasyonuna benzer şekilde çoğaltılır. DNA amplifikasyonu Kary Mullis isimli bir biyokimyacı tarafından ilk olarak 1983 yılında geliştirilmiştir ve ardından ilk başarılı DNA amplifikasyon çalışması Saiki ve arkadaşları ile 1982 yılında gerçekleştirilmiştir.

- PZR için Gerekli Bileşenler :
 - Hedef diziyi taşıyan kalıp DNA
 - Kalıp DNA ile eşleşecek olan 2 oligonükleotid primeri
 - Dört tür dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
 - Termostabil DNA Polimeraz Enzimi (taq, Vent)
 - Tampon
 - MgCl₂

PZR protokolü çalışmamızdaki yöntem göre ve çalıştığımız konu ile paralel olarak istenilen sayıda döngüden oluşabilir. PZR döngüsünün aşamaları sırasıyla denatürasyon adı verilen yüksek sıcaklıklarda iki zincirin birbirinden ayrılması, bağlanma adı verilen sentetik oligonükleotidlerin yani komplementer dizilerin kalıp moleküle bağlanması ve son olarakta zincirin yeni çift zincirli DNA' lar oluşturacak şekilde uzaması aşamasıdır (Şekil 15).



Şekil 16: Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Bir Siklusun Aşamaları (Vierstrate A. Principle of the PZR. 1999)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çeşitleri :

1- İnvers (Tersine Dönmüş) PZR

2- Homopolimerli PZR

3- Kantitatif PZR

4- Multipleks PZR

5- Hot start PZR

6- In situ PZR

7- Nested, seminested PZR

8- RT (Revers transcriptase) PZR

9- Touch down PZR

10- Consensus PZR

11- Real time PZR (60,61).

2.11. Elektroforez

Jel elektroforez yöntemi, izole edilmiş ve saflaştırılmış nükleik asitlerin ve proteinlerin molekül ağırlıkları, alt tipleri ve miktarlarına göre tespit edilmesinde ve görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. En sık kullanılan jel elektroforez yöntemi çeşitleri ise nükleik asitler ile çalışmada agaroz jel elektroforezi ve proteinler ile yapılan çalışmalarda ise poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) yöntemleridir. PAGE’ de özellikle ‘’sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)’’ tüm protein çeşitleri ile yapılan çalışmalarda tüm proteinler ile sonuç vermektedir. Elektroforez, ortamda çözülmüş halde bulunan moleküllerin elektrik alan içerisinde elektrik yüklerine, moleküler ağırlıklarına göre göç etmeleri prensibine dayanır. Moleküler ağırlıklarına göre büyük moleküler ağırlığa sahip moleküller ağır ve güç hareket ederken, moleküler ağırlıkları daha küçük olan moleküller ise daha hızlı ve kolay hareket ederler. Hareket eden moleküllerin hareket yönleri yani anoda + kutuba ya da katoda – kutuba hareket edecekleri moleküllerin net yükleri tarafından belirlenir. DNA ve RNA molekülleri yapılarındaki serbest fosfat gruplarından dolayı negatif yüklü moleküller olduklarından jelde katoddan anoda doğru hareket ederler. Protein moleküllerinde ise yapılarında hem negatif hemde pozitif yüklü bileşenler taşıdıklarından bunların hareket yönü ph düzeyi değiştirilerek istenilen yönde olabilmektedir ki örneğin ph 5 ve üzeri ise proteinler negatif yükleneceklerinden anoda doğru hareket göçüne başlarlar. Bu göçün hızı aynı şekilde molekül ağırlığına, yapısal özelliklerine, ortam koşullarına, iyonik kuvvete ve uygulanmakta olan akımın güç ve süresine bağlı olarak ddeğişkenlik gösterir. Jel üzerinde yürüttüğümüz molekülümüzün final pozisyonunu belirlemek için UV ışık altında kullanılan etidyum bromür (EB) veya bezeri bir ışıyıcı madde kullanılmaktadır(63).

Elektroforetik Yöntem Türleri :

- PAGE
- Agaroz Jel Elektroforezi
- Değişken Alanlı (Pulsed Field) Jel Elektroforezi
- İzoelektrik Odaklanma
- İki Boyutlu (2D) Jel Elektroforezi
- Kılcal (Kapiller) Elektroforez
- Immunoelektroforez

Elektroforez yöntemlerinde kullandığımız agaroz bir alg türünden elde edilmektedir. Jel hazırlanan elektroforez tamponuna agarozun eklenip yüksek sıcaklıklarda homojinize bir şekilde çözünmesi sağlanarak hazırlanır. Yüksek derecelere kadar ısıtılıp kaynatılan çözelti 50 derece civarına düşürülerek jel tepsisine dökülür. Soğudukça jel formuna dönüşen çözeltiye örneklerimizin yüklenmesi için gerekli olan kuyucukları oluşturmak için jel tarağı batırılır ve bu şekilde örneklerimizi yükleyebileceğimiz kuyucuklar oluşur. Hazır hale gelen jelden sonra elektroforez protokolü uygulanarak örneklerimizi yürütebilir ve tespit edebiliriz. Nükleik asitlerin agaroz jel elektroforezinde ki hareketleri moleküllerin molekül ağırlıklarına ve agaroz jelin konsantrasyon, por büyüklüğüne bağlıdır. Agaroz jel elektroforezi ile farklı kaynaklardan izole edilmiş nükleik asitler ve restriksiyon endonükleazlar ile kesime tabi tutulmuş hedef nükleik asit dizileri molekül ağırlıklarına göre yürütülebilir ve nihayetinde tespit edilip görüntülenebilirler(60, 63).

3.YÖNTEMLER

3.1. Materyal – Metod

Yeditepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 05.03.2013 tarihinde 305 sayı numarası ile onay ve izinleri alınan bu çalışmada, çalışma grubu olarak HIV NEGATİF olduğunu belirten ve çalışma hakkında bilgi verilip onam formu imzalatılarak serum örnekleri alınıp ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemi ile alınan örnekler çalışılarak negatiflikleri desteklenen 50 HIV NEGATİF (18 kadın, 32 erkek) birey ; kontrol grubu olarak da yine bilgilendirme yapıp onamları alınmış farklı merkezler de daha önce tanısı konulmuş, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' nda da ELISA yöntemi ile pozitiflikleri desteklenen 50 HIV POZİTİF (4 kadın, 46 erkek) birey olmak üzere toplam 100 olgunun kan örnekleri alındı ve çalışmada kullanıldı.

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Departmanın' dan (Türkiye) Turgay İsbir ve arkadaşları ayrıca Ulusal Allerji ve Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsün' den (A.B.D.) Reza Abdi ve arkadaşları tarafından Kemokin reseptörlerinde meydana gelen polimorfizmi saptamak üzere geliştirilerek optimize edilmiş olduğu ve diğer polimeraz zincir reaksiyonu türlerine göre duyarlılığının daha yüksek ve yorumunun daha sağlıklı olduğu bildirilen Klasik PZR yöntemi ile Techne Thermal TC-512 (Techne, A.B.D.) gradient PZR sisteminde,

CXCR4 VE CCR5 kemokin reseptörlerinde ki mutasyonu saptamak üzere önerilen primer setleri, mutasyonun olması gereken elimizdeki DNA molekülünün anlamlı bölgesini keseceğimiz restriksiyon enzimleri, kestiğimiz anlamlı bölgeleri çoğalttığımız primer setleri, DNA moleküllerini yürütmede kullandığımız Prona marka agaroz jel ve jelin yürütüldüğü BIORAD marka elektroforez, agaroz jeldeki moleküllerin görüntülenmesini sağlayan BIORAD GelDoc 2 görüntüleme sistemi kullanılarak çalışıldı.

3.2. DNA İzolasyonu

Çalışmaya katılan bireylerden jelli kan tüplerine alınan kan örnekleri oda ısısında yaklaşık 10 dakika pıhtılaşmaya kadar beklendi ve ardından oda ısısında 2000g de santrüfujde 4 dakika işleme tabi tutuldu. Bu işlem sonucunda bireylerden alınan tam kan örneğinden kanın serumunu ayırdık ve DNA izolasyonu için bu serum örneklerini kullandık. Araştırmaya katılan kişilere ait DNA' ları serum örneklerinden Roche marka Magna Pure Compact Nükleik asit Otomatik İzolasyon Kiti 1 isimli otomatik izolasyon kiti ile Roche marka MagNa Pure Compact otomatik izolasyon cihazın da izole edilmiştir.

Ekstraksiyon için, Roche MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit 1 içinden çıkan kartuşların numune kısmına 500 µl katılımcı bireylerin serumlarından eklendi. Ardından Roche MagNa Pure Compact otomatik izolasyon cihazının izole edilen DNA molekülünün aktarılacağı kısma üzerine katılımcı isim ve kodları yazılan steril numune kabı yerleştirildi. Roche MagNa Pure Compact otomatik izolasyon cihazı ile 45 dakika da 10 katılımcının, toplamda 4500 dakikada 100 katılımcının DNA moleküllerini elde ettik.

3.3. PZR Çalışmaları

3.3.1. CXCR4 Kemokin Reseptörü için I. PZR Çalışmaları

Çalışmamızın 1. Aşaması, Klasik PZR yöntemi ile Teche Thermal Cycler TC-512 (Techne, U.K.) klasik PZR cihazı ile çalışıldı. Klasik PZR çalışma prensibi çift iplikli DNA molekülündeki hedef bölge dizilerine iki oligonükleotid primerin bağlanması ve zincirin uzaması esasına dayanır.

Çalışmamızın CXCR4 kemokin reseptörü için birinci aşaması steril su, dNTP, MgCl₂, spesifik olan forward ve reverse primerleri, reaksiyon buffer, Taq polimeraz enzimi olmak üzere temel PZR bileşenleri kullanılarak, optimizasyonu yapılmış olan

PZR protokolüne uyularak ile Techne marka Thermal Cyclers TC-512 (Techne, U.K.) PZR cihazı kullanılarak yapıldı (Tablo 5,6,7). Bu aşama 50 HIV negatif bireyden oluşan çalışma grubu ve 50 HIV pozitif bireyden oluşan kontrol grubu için toplam 100 birey için uygulandı.

Tablo 5: Klasik PZR CXCR4 için Kullanılan Primer Dizileri

Klasik PZR	Primer Dizisi
Forward	TTGGTTTTGTGGGCAACATGAT GG
Reverse	CATTGCATTCCCAAAGACCCAC TC

Tablo 6 : PZR Bileşenleri (CXCR4)

Bileşen	Miktar
Su	17,5 µl
Dntp	1,5 µl
MgCl ₂	1,5 µl
Forward Primer	0,5 µl
Revers Primer	0,5 µl
Reaksiyon Buffer(10X)	2,5 µl
Taq	0,3 µl
DNA	1 µl
Toplam Hacim	25,3 µl

Tablo 7 : CXCR4 için I.Aşama PZR Protokolü

Analiz Modu	Segment	Dönüşüm	Sıcaklık (°C)	Hold Time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition Mode
Başlangıç denatürasyonu						
Yok	1	1	94	00:04:00	20	Yok
Amplifikasyon						
Amplifikasyon	Ayrılma	35	94	00:00:30	20	Yok
	Bağlanma		52	00:00:45	20	Single
	Uzama	72	00:01:00	20	Yok	
Soğutma aşaması						
Yok	1	1	72	00:07:00	20	Yok
Yok	1	1	4	∞	20	Yok

3.3.2. CCR5 Kemokin Reseptörü için I.PZR Çalışmaları

Çalışmamızın 1. aşaması, Klasik PZR yöntemi ile Techne Thermal Cycler TC-512 (Techne, U.K.) cihazında çalışıldı.

Klasik PZR çalışma prensibi çift zincirli DNA molekülünde ki hedef bölgelere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve zincirin uzaması esasına dayanır.

Çalışmamızın CCR5 kemokin reseptörü için birinci aşaması steril su, dNTP, MgCl₂, spesifik olan forward ve reverse primerleri, reaksiyon buffer, Taq polimeraz enzimi olmak üzere temel PZR bileşenleri kullanılarak, optimizasyonu yapılmış olan PZR protokolüne uyularak ile Techne marka Thermal Cycler TC-512 (Techne, U.K.) PZR cihazı kullanılarak yapıldı (Tablo 8, 9, 10). Bu aşama 50 HIV negatif bireyden oluşan çalışma gurubu ve 50 HIV pozitif bireyden oluşan kontrol grubu için toplam 100 birey için uygulandı.

Tablo 8 : Klasik PZR CCR5 için Kullanılan Primer Dizileri

Klasik PZR	Primer Dizisi
Forward	TTGGTTTTGTGGGCAACATGAT GG
Reverse	CATTGCATTCCCAAAGACCCAC TC

Tablo 9 : PZR Bileşenleri (CCR5)

Bileşen	Miktar
Su	3,2 µl
dNTP	1,5 µl
MgCl ₂	1,5 µl
Forward Primer	0,5 µl
Revers Primer	0,5 µl
Reaksiyon Buffer(10X)	2,5 µl
Taq	0,5 µl
DNA	5 µl
Toplam Hacim	15,2 µl

Tablo 10 : CCR5 için I.Aşama PZR Protokolü

Analiz Modu	Segment	Dönüşüm	Sıcaklık (°C)	Hold Time (hh:mm:ss)	Final Ramp Rate (°C/s)	Acquisition Mode
Başlangıç denatürasyonu						
Yok	1	1	95	00:05:00	20	Yok
Amplifikasyon						
Amplifikasyon	Ayrılma	35	95	00:00:30	20	Yok
	Bağlanma		61	00:00:35	20	Single
	Uzama		72	00:00:45	20	Yok
Soğutma aşaması						
Yok	1	1	72	00:01:00	20	Yok
Yok	1	1	4	∞	20	Yok

3.4. I. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrophoresis Yöntemi İle Tespit Edilmesi

PZR sonucu elde ettiğimiz izolatların anlamlı olup olmadığını saptamak için bu izolatları agaroz jel elektrophoresis de moleküler ağırlıklarına göre ayırmalarını yaptık.

Agaroz jeli %0.5 konsantrasyonda hazırladık. Hazırlarken 2 gram toz agaroz hassas terazide ölçülerek steril erlenin içine konuldu. Ardından % 0.5' lik TBE (Tris Borate Edta) yavaşça ilave edilerek mikrodalga da homojenize oluncaya kadar ara ara

karıştırılarak kaynatıldı. Ardından elektroforez tankına döküldü ve biraz soğuması beklenip tankın tarağı yerleştirildi. Bu sırada yürütme tamponu olarak %0.5' lik TBE hazırlandı. %0.5' lik Agaroz jel donduktan sonra tampon jelin üstüne dökülerek, agaroz jel tampona gömüldü. Ardından steril bir alanda örnek başına 1ml CyberGold, 2ml loading dye hazırlandı ve bu karışıma 3ml PZR ürününden eklendi ve agaroz jelin kuyucuklarına dikkatli bir şekilde kontaminasyona dikkat edilerek yüklendi (Tablo 11).

Tablo 11 : Elektroforez İşlemi Bileşenleri

Bileşen	Miktar
Loading Dye	2 µl
Syber-Gold	1 µl
DNA	3 µl
Toplam Hacim	6 µl

Agaroz jelin kuyucuklarına yüklenen örnekler 30 dakika boyunca 1230 miliamper de 100 volt gücünde akıma maruz bırakılarak moleküler ağırlıklarına göre ayrımları sağlandı. Süre sonunda oluşan bantlar BIORAD GelDoc 2 görüntüleme sistemi ile UV ışık altında ve cihaza ait kamera ile görüntülenerek fotoğraflandı.

Burada amacımız elimizdeki DNA moleküllerinin anlamlı seviyede olduğunu ve bizim için anlamlı olan bölgeyi elde ettiğimizi görmektir. Bizim hedef bölgemiz 236 bp (base pair = baz çifti) boyutunda olduğundan; bizim için anlamlı olan DNA molekülü 236bp büyüklüğünde olanlardı.

3.5. Restriksiyon Aşaması

Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, DNA molekülü üzerinde ki hedef bölgeyi spesifik olarak tanıyan ve bu hedef bölgedeki hedef baz dizisini özgül olarak kesen enzimlerdir. Kesim protokolü uygulandığında substrat olarak kullanılan DNA molekülü miktarı ve optimum sıcaklık seviyesi RE enzim performansını etkiler. RE enzimlerinin kesim protokolünde maksimum performans gösterdiği optimum sıcaklık derecesi 37 derecedir. RE enzimlerinin küçük hacimlerde yüksek miktarda substrat ile yani DNA molekülü ile karşılaşması enzim difüzyonuna engel olmaktadır. Aynı şekilde düşük

konsantrasyon da DNA molekülü yani substrat oluşu yine RE enzim verimini önemli ölçüde etkilemektedir.

3.5.1. CXCR4 Kemokin Reseptörü Restriksiyon Aşaması

5.25 ul' lik karışım önceden etiketlenmiş steril PCR tüplerine steril koşullarda otomatik pipet kullanılarak dağıtıldı ve en son tüplere 5 ul PZR ürünü eklendi (Tablo 12). Enzim kesimi, enzim için önerilen yukarıda belirtilen protokol ile 37 derece de 120 dakika uygulandı.

Tablo 12 : CXCR4 için Restriksiyon Enzim Kesim Protokolü

Bileşen	Miktar
Su	4,5µl
Reaksiyon Buffer	0,5µl
Enzim	0,25µl
PZR Ürünü	5µl
Toplam Hacim	10,25 µl

3.5.2. CCR5 Kemokin Reseptörü Restriksiyon Aşaması

20 ul' lik karışım önceden etiketlenmiş PCR tüplerine dağıtıldı ve üzerine 10 ul PZR ürünü eklendi (Tablo 13). Enzim kesimi, enzim için önerilen yukarıda belirtilen protokol ile 37 derece de 120 dakika uygulandı.

Tablo 13 : CCR5 için Restriksiyon Enzim Kesim Protokolü

Bileşen	Miktar
Su	17µl
Reaksiyon Buffer	2µl
Enzim	1µl
PZR Ürünü	10µl
Toplam Hacim	30 µl

3.6. Kesimi Yapılan Hedef Bölgelerin Agaroz Jel Elektrofrezinde Gösterilmesi

Restriksiyon enzimleri ile hedef bölgenin kesilmesinden sonra elde ettiğimiz ürünlerin doğruluğunu ve bir mutasyon olup olmadığını saptamak için bu ürünlerin agaroz jel elektrofrezinde moleküler ağırlıklarına göre ayırımlarını yaptık.

Agaroz jeli %0.5 konsantrasyonda hazırladık. Hazırlarken 2 gram toz agaroz hassas terazide ölçülerek steril erlenin içine konuldu. Ardından % 0.5' lik TBE (Tris Borate Edta) yavaşça ilave edilerek mikrodalga da homojenize oluncaya kadar ara ara karıştırılarak kaynatıldı. Ardından elektrofrez tankına döküldü ve biraz beklenip tankın tarağı yerleştirildi. Bu sırada yürütme tamponu olarak %0.5' lik TBE hazırlandı. %0.5' lik Agaroz jel donduktan sonra tampon jelin üstüne dökülerek, agaroz jel tampona gömüldü.

Ardından steril bir alanda örnek başına 1 µl CyberGold, 2 µl loading dye hazırlandı ve bu karışıma 5 µl PZR ürünü eklendi ve agaroz jelin kuyucuklarına dikkatli bir şekilde yüklendi (Tablo 14).

Tablo 14 : II. Aşama Elektroferez Bileşenleri

Bileşen	Miktar
Loading Dye	2 µl
Syber-Gold	1 µl
Kesim Ürünü	5 µl
Toplam Hacim	8 µl

Agaroz jelin kuyucuklarına yüklenen örnekler 30 dakika boyunca 1230 miliamper de 100 volt gücünde akıma maruz bırakılarak moleküler ağırlıklarına göre ayrımları sağlandı. Süre sonunda oluşan bantlar BIORAD Gel Doc 2D (ABD) görüntüleme sistemi ile UV ışık altında ve de kamera ile görüntülendi.

Burada amacımız elimizdeki DNA moleküllerinin anlamlı seviyede olduğunu ve bizim için anlamlı olan bölgeyi elde ettiğimizi görmektir. Bizim hedef bölgemiz 236 bp (base pair = baz çifti) boyutunda olduğundan; bizim için anlamlı olan DNA molekülü 236bp büyüklüğünde olanlardı.

4. SONUÇLAR

Araştırmaya dahil olan 50 HIV/ AIDS Negatif olgu ile yapılan çalışmada; numuneler alınmış, alınan numunelerden otomatik yöntemle DNA izolasyonları yapılmış ardından elde edilen izolatlar ilk PZR aşaması olan klasik PZR yöntemi ile anlamlı derecede çoğaltılıp agaroz jel elektrofrez tekniği ile görüntülenmiştir. Ardından elimizdeki mevcut izolatları hedef bölgemizi elde etmemizi sağlayacak bölgeye özgü restriksiyon enzimlerimiz ile kesim için ikinci bir PZR protokolüne tabi tuttuk ve elde ettiğimiz ürünleri tekrar agaroz jel elektrofrezinde görüntüledik. Agaroz jel görüntüsünde bant vermeyen DNA molekülleri tekrar agaroz jel de yürütülmüştür, yine görüntü vermeyen DNA molekülleri kesim protokolünden başlanarak tekrar işleme alınmıştır (Şekil 16). Yaptığımız bu işlemler sonucunda elde ettiğimiz DNA bant görüntülerinde anlaşıldı ki çalışmaya dahil olan çalışma gurubumuzda ki 50 HIV negatif bireyin sahip oldukları CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörlerin de bir mutasyon mevcut değildir. Yani araştırmaya katılan 50 birey çalışma konumuz olan CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörlerin de doğuştan gelen mutasyon sonucu HIV enfeksiyonuna karşı dirence sahip değildir. Gerçekleştirilen restriksiyon aşamasının ardından yapılan

agaroz jel elektroforez yöntemi ile görülmüştür ki tüm olgulara ait oluşan DNA bantları CCR5 için 236 bp, CXCR4 için ise 190 bp büyüklüğünde' dir, yani tüm bireylerin wild type DNA molekülüne sahip olduklarını CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörlerinde bir gen polimorfizmine sahip olmadıklarını, buna bağlı olarak bireylerin HIV virüsüne karşı bir dirençlerinin olmadığını gösterir (Tablo 15). Çalışmamız da kontrol grubu olarak 50 HIV/AIDS pozitif birey de kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir (Tablo 16).



Tablo 15 : Araştırma kapsamında ki kontrol grubuna dahil 50 HIV/AIDS negatif bireyin karşılaştırmalı sonuçları.

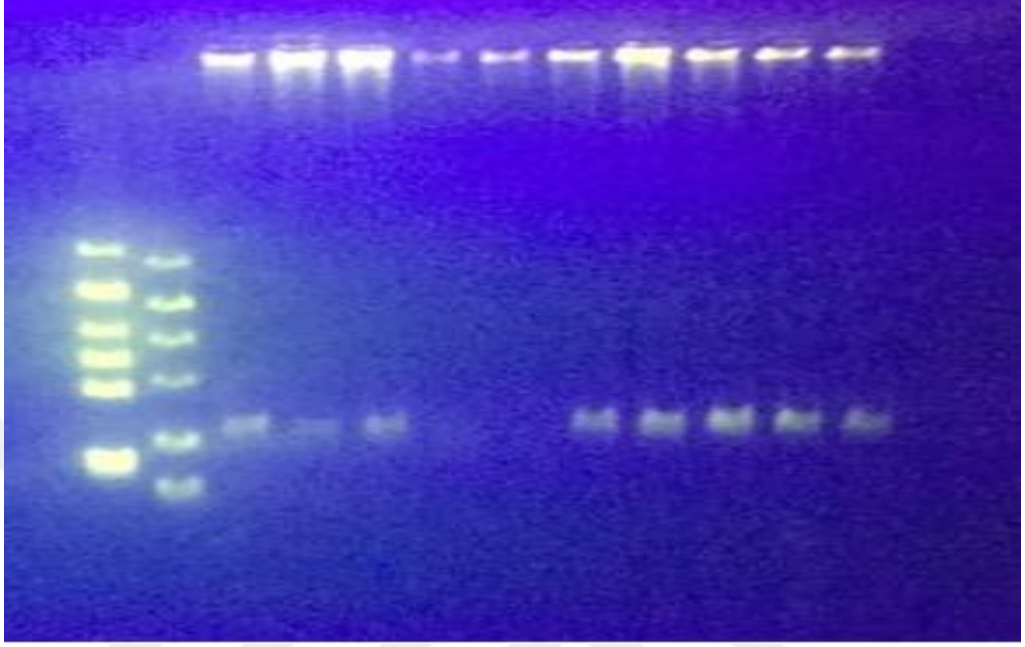
KATILIMCI AD-SOYAD/KOD	CİNSİYET K/E	ELISA SONUCU <1 negatif ≥1 reaktif	Çalışma Sonucu Wild type/Mutant
Selda YT.	E	0.09	W
Aysel Ç.	K	0.12	W
Serkan S.	E	0.35	W
Uğur K.	E	0.12	W
Hakan K.	E	<0.05	W
İbrahim A.	E	0.29	W
Hatice F.	K	0.16	W
Yunus K	E	0.12	W
Hediye G.	K	0.11	W
Aysun E.	K	0.06	W
Bilgehan A.	E	0.06	W
Ece Ö.	K	<0.05	W
Beril K.	K	0.11	W
Boran D.	E	0.09	W
Suat A.	E	0.10	W
Ayten E.	K	0.35	W
Yücel T.	E	<0.05	W
Pınar T.	K	0.12	W
Sevim Ö.	K	<0.05	W
Erdem B.E.	E	0.30	W
Enver S.C.	E	0.16	W
Merve K.	K	0.30	W
Orhan I.	E	0.32	W
Mehmet O.M.	E	0.21	W
Berat A.	E	0.10	W
Gökhan A.	E	0.10	W
Uğur T.	E	0.48	W

Taner E.	E	0.80	W
Murat S.	E	<0.05	W
Hüseyin U.	E	0.20	W
Ersin Y.Ç.	E	<0.05	W
Eren Y.	E	0.15	W
Ali A.	E	0.61	W
Rauf K.A.	K	0.53	W
Yiğit D.	E	0.57	W
Barış B.Y	E	0.16	W
İsmail G.	E	0.10	W
Ebru B.	K	<0.05	W
Bora E.	E	0.60	W
Erdoğan S.	E	0.10	W
Alican B.	E	0.60	W
Binnur S.	K	<0.05	W
Yusuf B.	E	<0.05	W
Rıfat D	E	0.50	W
Gözde A.	K	0.10	W
Mert A.	E	<0.05	W
Gamze B.	K	0.50	W
Zeynep Y.	K	0.15	W
Bahar A.Ç.	K	0.10	W
İrmak D.	K	<0.05	W

Tablo 16 : Araştırma kapsamında ki kontrol grubuna dahil 50 HIV/AIDS pozitif bireyin karşılaştırmalı sonuçları.

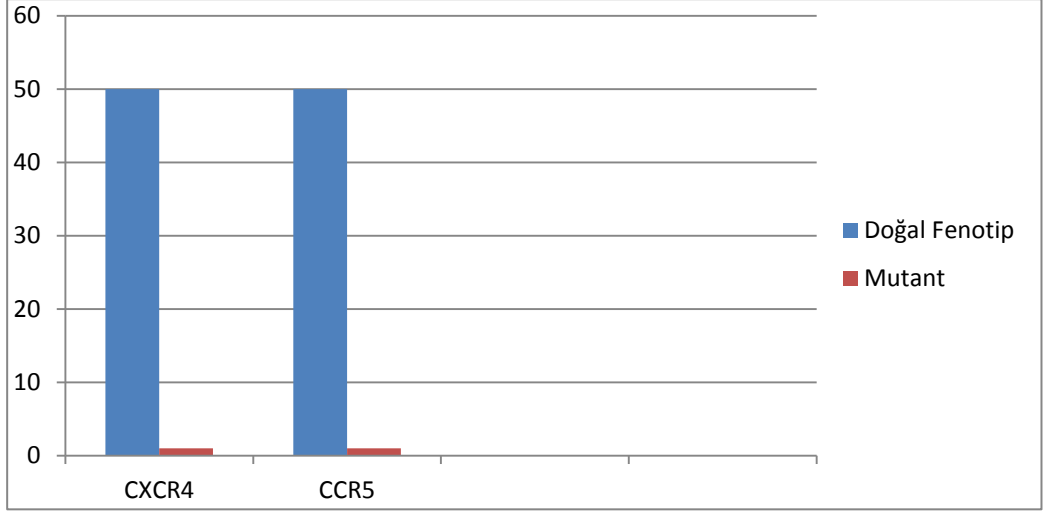
KATILIMCI AD-SOYAD/KOD	CİNSİYET K/E	ELISA SONUCU <1 negatif ≥1 reaktif	Çalışma Sonucu Wild type/Mutant
EMAKDA79	E	10.91	W
ANGRAN89	E	>12	W
CEGÖHA85	E	>12	W
ÖMTUMU85	E	7.34	W
UMDEHA83	E	>12	W
ERÇEİS88	E	>12	W
SOGÖHÜ77	E	>12	W
ALAHŞE92	E	>12	W
AHÇEÖZ85	E	>12	W
MUKAİL85	E	>12	W
RAORBE84	E	>12	W
LİCECA78	E	9.67	W
AZRAMU76	K	9.63	W
MÜADHA92	E	>12	W
FAÇEFE87	E	>12	W
ZAÇAAY74	E	7.82	W
ANUYMU91	E	>12	W
ALSEUL77	E	>12	W
LİKOVİ78	K	>12	W
SHURRA75	K	>12	W
VİABLE68	E	6.69	W
EMAYAL67	K	>12	W
TAAHYA68	E	>12	W
ZEGÖYİ71	E	8.72	W
HAKÜAH91	E	>12	W
KUZEAB88	E	>12	W

MUSOVA83	E	>12	W
ERAYEY56	E	>12	W
HİATAB79	E	6.35	W
GÜÖZMA80	E	>12	W
ONEMRE83	E	>12	W
ALSAİS63	E	>12	W
EKAĞCA89	E	>12	W
ÜNSUŞE83	E	>12	W
MUAŞAH85	E	>12	W
İBKİİS92	E	10.23	W
CEBOHA80	E	>12	W
UĞSABE96	E	>12	W
CEENME82	E	>12	W
ATYİHA90	E	>12	W
MUGÖHA78	E	7.8	W
TABIHA82	E	>12	W
TOKÖCE69	E	>12	W
TOÇAYU78	E	8.7	W
SEFETA83	E	>12	W
ROHAŞA74	E	>12	W
ERÇAHA95	E	>12	W
HAÇAŞE86	E	7.9	W
BİKOB091	E	>12	W
MUBİMU89	E	>12	W

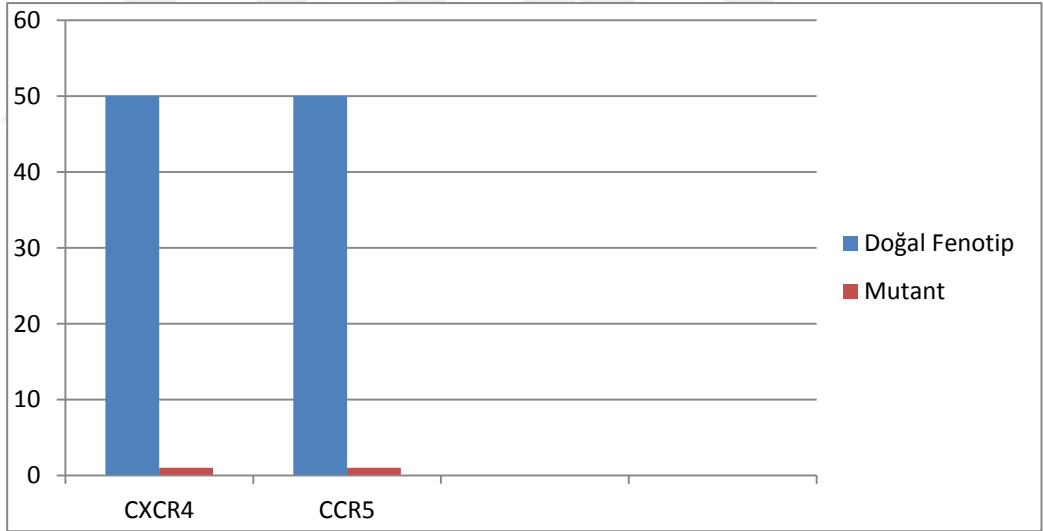


Şekil 17 : Çalışma Dahilinde ki 10 Örneğe Ait DNA Bantlarının Agaroz Jel Görüntüsü (UV ışık altında)

Eğer CXCR4 kemokin reseptörü için agaroz jel üzerinde elde ettiğimiz bant yaklaşık 173 bp olsaydı, bu durumda bir mutasyon varlığını tespit etmiş olurduk. Aynı şekilde CCR5 kemokin reseptörü için agaroz jel üzerinde elde ettiğimiz bant 201 bp civarında olsaydı, aynı şekilde bir mutasyon, gen polimorfizminden bahsetmiş olacaktık.



Şekil 18: Klasik PZR ve I.aşama agaroz jel elektroforezi ile CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörlerinde mutasyon varlığı aranan 50 HIV/AIDS negatif bireyden oluşan çalışma grubu mutant ve doğal fenotip sonuçları



Şekil 19: Klasik PZR kesim protokolü ve II.aşama agaroz jel elektroforezi ile CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörlerinde mutasyon varlığı aranan 50 HIV/AIDS negatif bireyden oluşan çalışma grubu mutant ve doğal fenotip sonuçları

5.TARTIŞMA

5.1. CXCR4 ve CCR5 Kemokin Reseptörlerinde Meydana Gelen Mutasyonun HIV Enfeksiyonu Açısından Önemi

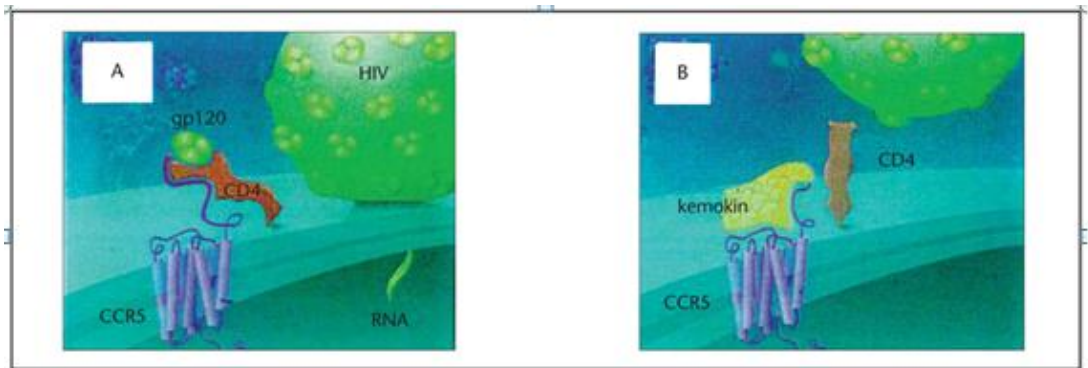
HIV' in oluşturduğu hastalıkta ve patogeneizde ana belirleyici, CD4 eksprese eden T hücreleri ve makrofajlara karşı virüsün gösterdiği tropizimdir. HIV' in neden olduğu immünosupresyon (AIDS), bağışıklık sisteminin yardımcı ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık fonksiyonu taşıyan CD4 T hücre sayısındaki azalmadan kaynaklanır. Konak hücrenin enfeksiyonu için viriyonun gp 120 proteininin konak hücre membranının yüzeyinde lokalize olan CD4 reseptörüne bağlanması gerekir. Lenfositler ve monositler üzerinde CD4 ile gp120 arasında ilk bağlanmadan sonra HIV-1' in hedef hücreye girişini ilerleten farklı koreseptörler de tanımlanmıştır. Bu reseptörler kemokin reseptörleri olup CCR5 ve CXCR4 olarak adlandırılır. CCR5 sadece monosit ve makrofajlarda bulunurken, enfeksiyonun erken evrelerinde bulunan sinsiyum oluşturmeyen fenotipe sahip M (makrofaj) tropik virüslerle enfeksiyona olanak sağlar. CD4+ T hücrelerinde yer alan koreseptör ise CXCR4 olup, bu kemokin reseptörü ise sinsiyum oluşumundan sorumlu olan ve sadece T hücrelerine tropizm gösteren izolatları bağlar(3, 9).

CCR5 reseptörü açısından yetersiz olan insanlar HIV ile enfeksiyona daha dirençlidir. CCR5 antiviral ilaçlar için hedef reseptördür. HIV CD4 T hücrelerinin enfeksiyonunu kolaylaştırmak için DH*SIGN denilen bir lektin molekülü aracılığıyla dendritik hücre yüzeyine bağlanır ve yüzeyinde kalır. Makrofajlar ve dendritik hücreler HIV ile persistan şekilde enfekte olurlar ve böylece ana rezervuar görevi görürler. Bu şekilde de HIV' in yayılmasında ana araçlardır. gp 120' yi kodlayan env geninde meydana gelen mutasyonla virüs tropizmi CCR5 (M tropik)' den CXCR4 (T tropik) virüse değişir. T-tropik virüsün gp-120' si C ve CXCR4 kemokin reseptörüne bağlanır. Bazı virüsler iki reseptörü de yani hem CCR5 hem de CXCR4' ü kullanır. CXCR4' ü tercih yönündeki reseptör değişimi geç oluşur ve hastalığın ilerlemesi ile korelasyon içerisindedir. CD4 T hücre sayısındaki azalma, direk olarak HIV ile indüklenen sitolizden, sitotoksik T hücrelerinin indüklediği immün sitolizden veya büyük miktardaki HIV antijenine karşı kronik aktivasyondan kaynaklanabilmektedir (3, 9, 23).

İnsan retrovirüslerin'den HIV' in replikasyonu, viral glikoprotein çıkıntılar olan gp120 ve gp41 trimerinin primer reseptör olan CD4 proteinine ve yardımcı reseptör

olan transmembran G-proteinli kemokin reseptörüne bağlanması ile başlar. Yardımcı reseptör makrofajlarda, periferik veya diğer T hücrelerinde bulunan CCR5 yada primer olarak T hücrelerinde eksprese olan CXCR4 kemokin reseptörüdür. Az sayıda insan HIV ile enfeksiyona dirençlidir, çünkü bu insanların yardımcı reseptörleri olan CCR5 ve CXCR4 kemokin reseptörlerinde mutasyon vardır (10). CCR5 geninde homozigot delesyon içeren kişiler virüsle çok kez karşılaşmalarına rağmen enfeksiyona dirençlidirler. Bu delesyon için heterozigot olan bazı enfekte kişiler ise, uzun süre AIDS aşamasına gelmedikleri tespit edilmiştir(4).

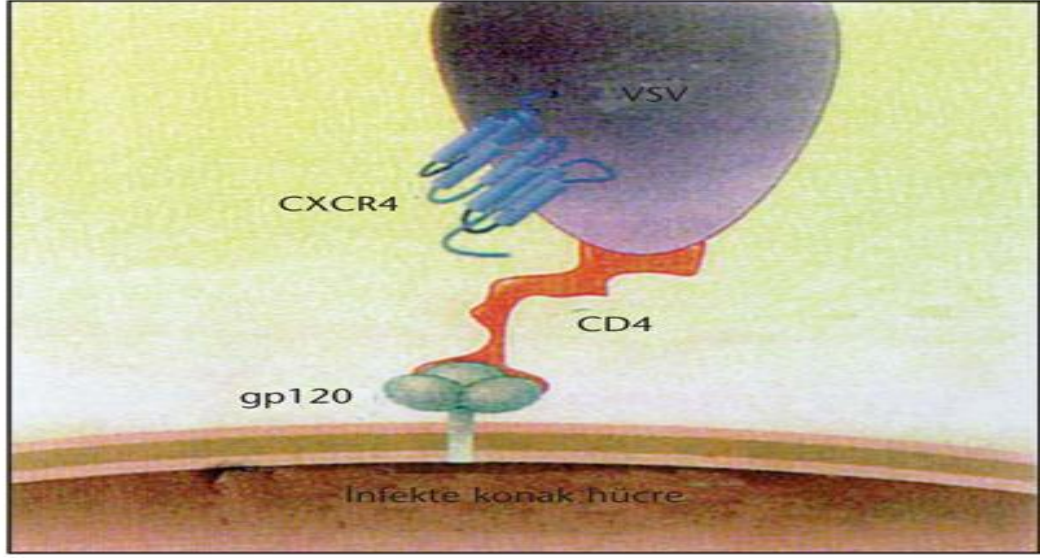
HIV/AIDS günümüzde Dünya üzerinde ki ölüm nedenleri listesinde 4. Sırada yerini alırken, bu durum Sahara altı Afrikada listeyi alt üst edip 1. sırada yerini almıştır. Henüz HIV' e karşı geliştirilmiş bir aşı yoktur ve enfeksiyonun önlenmesi virüs bulaşımını kontrol altında tutulmasına bağlıdır. Aşı çalışmaları, şifa arayışı hayvan modeli sistemleri ile araştırılsa da insan dışı primatlar bu çalışmalar için uygun model olamamaktadır. Bu nokta da gönüllü insanlar da HIV aşı denemeleri gündeme gelmiştir ve bu aşı modelleri arasında virüsün tümünü, kılıf proteinlerini, sentetik peptidleri, internal kor proteinlerini, canlı vektörleri ve nükleik asitleri içerenleri mevcuttur. Aşı çalışmalarından bir kısmı prelinik bir kısmı ise daha ileri seviyelere ulaşmış durumdadır(3, 4, 42). Paris Pasteur Enstitüsü bilim adamlarından Girard, HIV ile aşılandığı dört şempanzeden üç tanesinin HIV ile enfekte olmadıkları gözlemlemiştir. CXCR4 kemokin reseptörlerinin antiviral etkilerinden yararlanarak HIV' e karşı aşı geliştirilmesi yanında, gp41' in spesifik bölgesini bloke edecek monoklonal antikorlar da çalışmalarının yoğunlaştığı bir alandır (Şekil 17).



Şekil 20: HIV'in giriş kapısının bloke edilmesi

CCR5 kemokin reseptöründe meydana gelen delesyonu hedefleyen tedavi çalışmaları, HIV' in hücreye tutunmasını bloke edecektir(42, 50).

Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde AIDS tedavisinde kullanılacak vektör virüsler yaratılmıştır. Yapılan bu çalışmalar ile konak hücreye giriş için kendi glikoproteinleri olmayan; ancak CD4 ve CXCR4 ekspresyonu arttırılan vektör virüsler yüzeylerinde HIV glikoproteinleri bulunduran enfekte konak hücrelere bağlanarak, bu enfekte konak hücreleri imha edebilirler (Şekil 18).



Şekil 21: Vektör virüsün (CMV) enfekte hücreye bağlanması

Bu noktada bizim yaptığımız bu araştırma; CXCR4, CCR5 kemokin reseptörlerin de mutasyon barındıran ve bu mutasyon sayesinde HIV enfeksiyonuna direnç gösterip enfekte olmayan bireylerin belirlenmesine ve detaylı çalışmalar ile bu avantajın aşı çalışmalarına ışık tutmasına olanak sağlayacaktır.

5.2. Dünyada CXCR4 ve CCR5 Kemokin Reseptörlerin de Meydana Gelen Mutasyon Sonucu HIV Enfeksiyonuna Karşı Oluşan Direnç ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

1984 yılı itibari ile yapılan çalışmalar bu yana HIV'in konak hücreyi girişinde ve enfeksiyonun da ana reseptörün CD4 olduğunu, fakat CD4 hücrelerinin bu enfeksiyon için yeterli olmadığını çalışmalar ile öğrendik. HIV' in konak hücreye girişinde ve enfeksiyonunda CD4 ile birlikte etkili olan gerekliliklerin ne olduğu ilk olarak Feng ve arkadaşlarının 1996' da yayınladıkları bir çalışmayla gösterildi. Bu çalışmada kemokin reseptör ailesi içinde yer alan CXCR4, özellikle T-tropik HIV-1 ile konak hücre arasında enfeksiyonun ilk aşaması olan füzyon oluşumu ve HIV' in konak hücreye girişi için mutlak bir kofaktör olması gerektiği gösteriliyor(51).

CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörleri ve HIV enfeksiyonu arasındaki bağlantı, Aralık 1995' te Cocchi ve arkadaşları tarafından Science dergisinde yayınlanan araştırmalarında, Sitotoksik T hücrelerinin oluşturduğu kemokinlerin özel antiviral etkilerinin tespiti ile anlaşıldı(52).

1996 yılında Doranz ve arkadaşları, 1997 yılında ise Gallo ve arkadaşları yaptıkları araştırmalarla HIV enfeksiyonu ile kemokin reseptörleri arasındaki spesifik ilişkiyi gündeme getirmişlerdir(53, 54).

Samson ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışma ile CCR5 kemokin reseptörünün mutant bir alelinin beyaz popülasyonlar da yüksek bir sıklıkta mevcut olduğunu, ancak Batı ve Orta Afrika siyahi popülasyonlarında ve Japon popülasyonlarında bulunmadığını gösterdi. Kodlama bölgesi içindeki 32-baz çiftinin delesyonunun, bir çerçeve kaymasına neden olduğunu ve bunun sonucunda meydana gelen CCR5 kemokin reseptörünün HIV-1 suşları tarafından membran füzyonunu ve enfeksiyonunu desteklemeyen fonksiyonel olmayan bir reseptöre dönüştüğünü yaptıkları çalışmalar ile göstermişlerdir. HIV-1 ile enfekte olmuş beyaz deneklerin bir kohortunda, mutasyon için ayrı ayrı homozigot bulunamadı ve heterozigotların sıklığı genel popülasyona göre % 35 daha düşüktü. Delesyona uğrayan alel için ayrı bir homozigot olan beyaz kan hücrelerinin, M-tropik HIV-1 virüslerinin enfeksiyona karşı yüksek direnç gösterdiği bulundu, bu da CCR-5' in primer HIV-1 suşları için ana yardımcı reseptör olduğunu doğruladı. Ayrıca yaptıkları bu araştırma ile seropozitif hastalarda düşük heterozigot sıklığının kısmi direnci sağladığını da gösterdiler(55).

1997 yılında Schnell ile arkadaşları ve bireysel olarak Cohen tarafından yapılan farklı çalışmalarda transgenik tavşan hücrelerinde HIV replikasyonunun daha kolay olduğu gösterilmiştir ve bu çalışmalar rekombinant DNA teknolojisi sayesinde AIDS tedavisinde kullanılacak vektör virüslerin yaratılmasına olanak sağlamıştır. Yapılan bu araştırmalar ile konak hücreyi enfekte etmek için glikoproteinlerini kaybetmiş; CD4 ve CXCR4 ekspresyonu indüklenmiş vektör virüsler (Vesicular stomatitis virüs, Rhabdovirüs), üzerlerinde HIV glikoproteinleri bulunduran enfekte konak hücrelere spesifik olarak bağlanarak sitopatik etkileri ile bu enfekte konak hücreleri imha yetenekleri gösterilmiştir(56, 57).

O'Brien ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışma ile iki kemokin reseptörü CCR5 ve CXCR4 ün, HIV-1 girişi için ana yardımcı reseptör olarak T-reseptörü-etkileşimli CD4 molekülü ile birlikte görev yaparak, bu kemokin reseptörlerinin genlerinde enfeksiyonu etkileyebilecek bölgelerinde ortak genetik polimorfizm arayışını teşvik etti. Bu çalışma dört mutasyon varyantı olan CCR5-P1, CCR2-641, SDF1-3'A ve CCR5 delta 32 mutasyonu HIV-1 enfeksiyonuna yada AIDS' e veya her ikisine birden ilerleme oranında düzenleyici bir rol oynadıkları keşfedilmiştir. Bu aleller tarafından popülasyon genetik ilişkisini açıklamak için makul fizyolojik mekanizmalar ileri sürülmüş ve eleştirel olarak burada tartışılmaktadır. AIDS progresyonunun kemokin reseptörü ve ligand gen varyantları ile genetik varyasyonu, virüs-reseptör etkileşimini hedef alan yeni tedavilerin gelişimi bu çalışma ile ivme kazandı. Bu derlemede, AIDS kısıtlama genlerinin, hastalık ilerlemesi ve müdahalesi için fonksiyonel ve terapötik etkileri araştırılmıştır(58).

Su ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışma ile CCR5, CXCR4 ve CCR2 kemokin reseptörlerinin HIV enfeksiyonu için ne derece önemli yardımcı reseptörler olduklarını göstermişlerdir. CCR5 (CCR5-Δ32), CCR2 (CCR2-641) ve CXCR4 için primer bir ligand olan stromal türevli faktör SDF1 (SDF1-3'A) mutasyonlarının HIV-1 enfeksiyonuna ve başlangıcına karşı koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada hikayesi bilinen HIV-1 enfeksiyonu ve AIDS belirtileri olmayan, riskli davranış öyküsü olmayan 2341 kişiden oluşan bir çalışma gurubu ile dünya genelinde 70 popülasyonda üç lokuslu genotip frekans dağılımları incelenmiştir. Bu araştırma, bu reseptörlerde meydana gelen mutasyonların her birinin önemli alel frekans farklarının, dünya çapındaki popülasyonlar da AIDS için göreceli tehlikelerde kapsamlı bir varyasyona dönüştüğünü göstermektedir. Bununla birlikte, mutant gen taşıyıcılarına karşı doğal seleksiyon olduğuna dair bir kanıt bulunamamıştır. Son olarak, elde edilen

birleşik üç lokuslu genotip verileri, AIDS' in daha yaygın olduğu bilinen Güney Doğu Asya ve Afrika'daki en yüksek göreceli tehlikeyi açıkça göstermektedir(59).

5.3. HIV Enfeksiyonuna Dirençli Mutant CXCR4 ve CCR5 Kemokin Reseptörlerine Sahip Popülasyonların Saptanmasının Klinik Önemi

M-tropik HIV-1' in konak hücreye girişinde, enfeksiyonunda CD4 hücrelerine artı olarak gerekli reseptör, CCR5 kemokin reseptörüdür. CCR5 kemokin reseptörü, M-tropik HIV-1 türleri için koreseptör olarak görev yapar ve HIV-1 baskılayıcı etkilerini ve de buna bağlı olarak böyle enfekte bireylerde ki enfeksiyona karşı direncin nedenidir. CCR5 eksprese edemeyen bireyler, genellikle HIV-1 enfeksiyonu hücre yüzeyinde CCR5 ekspresyonunu bloke ederler. Bu mutasyonlar sonucunda CCR5 kemokin reseptörü konak hücre yüzeyinde eksprese edilmemesi de, enfeksiyondan temel sorumlu olan M-tropik HIV-1' in konak hücreyi enfeksiyonunu önlemekte ve bu bireyler HIV enfeksiyonuna karşı dirençli olmaktadır(38, 42, 50).

CCR5 kemokin reseptörü ve CXCR4 kemokin reseptörü ortak olarak HIV-2 tarafından da konak hücreye giriş ve konak hücre enfeksiyonu için kullanılmaktadır. CXCR4 kemokin reseptörünün, HIV-2 enfeksiyonunda bazı HIV-2 izolatları için ana reseptör olmakla birlikte, bu HIV-2 izolatlarının konak hücreyi enfeksiyonunda CD4 hücresine ihtiyacı olmadığı saptanmıştır HIV proliferasyonunun ve pandemisinin önüne geçilmesi için oluşturulan yeni algoritmlar; gen terapisi, aşı çalışmaları ve reseptör antagonistlerini kapsamaktadır.

CCR5 kemokin reseptörüne ait geninin delesyonunu hedef alan gen terapisi düşüncesi, HIV' in öncelikli olarak konak hücreye tutunmasını engelleyecek ve birey enfekte olmayacaktır.

Çalışmamızı gerçekleştirdiğimiz sınırlı popülasyon ile hedefimizde mevcut olan CXCR4 ve CCR5 kemokin reseptörlerinde mutasyona sahip bireyleri yakalayamadık. Araştırmanın yapıldığı birey sayısının artırılması ile daha anlamlı verilere ulaşılmasını sağlayacaktır.

B grubu kemokin reseptörlerinin virus karşıtı sonuçlarından yararlanarak HIV enfeksiyonunu önleyici aşı araştırmaları ile birlikte, gp41' in immün spesifik bölgesini bloke edecek monoklonal antikorlar üzerine çalışılmaktadır (50, 56, 57).

Sonuç olarak doğal mutasyonlar yada in vitro koşullar altında oluşturulan mutasyonlar ile elde edilen bu koreseptör antagonistleri HIV enfeksiyonunun önlenmesinde bir şifa göstergesi olmakla birlikte, var olan HIV enfeksiyonların da ise

klasik tedavide kombine şekilde kullanılarak viral yayılma kontrol edilebilir ve immün sistemin HIV'in etkisinden kurtarılmasına katkıda bulunur.

6. KAYNAKLAR

1. Floch , M., Kowdley, K. , Pitchumoni , C.S., Floch , N., Rosenthal , R., Scolapio , J. *Netter Gastroenteroloji* . İstanbul , Türkiye : Nobel Tıp Kitabevleri ; 2011 .
2. Erensoy S.HIV/AIDS. *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji Kitabı..* 2008 ss 212, 2008.
3. Yılmaz G, Midilli K. Retrovirüs Ailesi. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Etkenlere Göre İnfeksiyonlar Kitabından.3. Baskı Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ss 1841–1870, 2008.*
4. Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. *Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine”cytokine family.* Annu Rev Immunol 1991;9:617-48.
5. Baggiolini M, Loetscher P. *Chemokines in inflammation and immunity.* Immunol Today 2000;21:418-20.
6. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. *Gammainterferon transcriptionally regulates an early response gene containing homology to platelet proteins.* Nature 1985;315:672.
7. Rollins BJ. *Chemokines.* Blood 1997;90: 909-28.
8. Luster AD. *Chemokines-chemotactic cytokines that mediated inflammation.* N Engl J Med 1998; 338: 436-45.
9. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y et.al. *The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract.* Nature 1998;393:591-4.
10. Cochi F, DeVico AL, Garzino-Derna A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. *Idendification of RANTES, MIP-1_α and MIP-1_β as the major HIV-suppressive factors produced by CD-8⁺ T cells.* Science 1995;270:1811-5.
11. Oberlin E, Amara A, Bacheleire F. *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-lineadapted HIV-1.* Nature 1996;382:833-5.
12. Mummid S, Ahhja SS, Gonzales E, Anderson SA, Santiago EN, Stephan KT, et al. *Genealogy of the CCR5 locus and is associated with altered rates of HIV-1 diseases progression.* Nat Med 1998;4:350-7.

13. O'Brien SJ, Moore JL. *The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS*. Immunol Rev 2000;177:99-111.
14. Wilson , W.R., Sande , M.A. *Current Enfeksiyon Hastalıkları* . İstanbul , Türkiye : Nobel Tıp Kitabevleri ; 2004 .
15. Boffito M, Winston A and Owen A. *Host determinants of antiretroviral drug activity*. Curr Opin in Inf Dis 2005, 18:543.
16. Shafer, R.W. Genotypic Testing for HIV-1 Drug Resistance. In: Peiper L, Coffey S, Volberding PA, eds.HIV InSite Knowledge Base (textbook online) ; San Francisco: UCSF Center for HIV Information; April 2004.
17. Goussard J, Weverling GJ, van der Hoek L et al. *Carrier rate of zidovudine resistant HIV-1: the impact of failing therapy on transmission of resistant strains*. AIDS.2001, 15:2293.
18. www.aegis.com AIDS education global information system ,general information.
19. Murray , P.R., Rosenthal , K.S. *Tıbbi Mikrobiyoloji* . İstanbul , Türkiye : Atlas Kitapçılık ; 2008.
20. Rio , C.D., Curran , J.W., Epidemiology and prevention of acquired immunodeficiency syndrome and human immunodeficiency virüs infection In :Mandel , G.L., Bennett , J.E., Dolin , R. (eds) :Mandel , Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases , 5th ed. Philadelphia : Churchill Livingstone ; 2000: 1340.
21. Yılmaz G. Viral İnfeksiyonlarda Direnç: HIV .2.Türkiye Ekmud Bilimsel Platformu. Antimikrobiyal Direnç Kongre Bildiri Kitabı, ss 90-92, 11-14 Mart 2009, Ankara .
22. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M: Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature 373:123, 1995.
23. Abacıoğlu H. Antiretrovirallere Direnç Mekanizmaları ve Direnç Testleri.Ankem Dergisi 14 (No.3) :400-405, 2000.
24. T.C. Sağlık Bakanlığı . AIDS Savaşım Bülteni. Ankara , Türkiye ; 2000 ; 4.
25. Yılmaz, G., Akalın, H., Işık, N., Assaf, A.H., Töre, O., Badur, S. *First documented case of human immunodeficiency virüs type 2 infection in Turkey*. Serodiag and Immunother in Infect Dis 1996; 8 : 125.
26. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye de HIV/AIDS vakalarının yıllara göre dağılımı, Aralık 2005.

27. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A. *Medical Microbiology*. St Louis :Mosby ; 1998.
28. Tabak, F. *Enfeksiyon Hastalıkları*. İstanbul , Türkiye : Nobel Tıp Kitabevleri ; 2003.
29. Gessain, A., Dezzutti, C.S., Cowan, E.P., Lal, R.B. Human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2, In : Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A.(eds) : *Manuel of Clinical Microbiology* , ASM Press Washington ; 2007: 1999.
30. Krutzkes, D.R., Walker, B.D. HIV-1 : pathogenesis, clinical manifestations and treatment In : Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds) : *Fields Virology 5th ed.* : Wolters Kluwer , USA ; 2007 : 2187.
31. Shafer RW and Schapiro. *Drug resistance and retroviral drug development*. J Antimicrob Chemoth 2005, 55: 817.
32. Mansky L, Bernard. L. *AZT and AZT resistant RT can increase in vivo mutation rate HIV- 1*. J Virol 2000, 74: 9532.
33. Centers for Disease Control and Prevention : Public Health Service guidelines for the management of exposures to HBV, HCV, and HIV and recommendations for postexposure prophylaxis. *Morb Mortal Rep SD* : 1-42:2001.
34. Türker N, Örmen B. Antiretroviral Tedavi. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2006; 20(3): 207–217.
35. Yeni, P.G. et al : Antiretroviral therapy in adults : Updated recommendations of the International AIDS Society , USA Panel. *J Am Med Assoc* 292: 251-265, 2004.
36. Levy, J.A. *HIV and Pathogenesis of AIDS* , 7th ed. Washington, DC, ASM Press, 2007.
37. Knipe, D.M., Howley, P.N. *Virology* , 4th ed. Newyork : Lippicott Williams & Wilkins , 2001.
38. Luciw, P.A. Human Immunodeficiency Viruses and Their Replication In Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M.(eds) : *Fields Virology*, 3rd ed , Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers ; 1996 : 1881.
39. Freed, E.O., Martin, M.A. HIVs and their replication In : Knipe, D.M., Howley, P.N. *Fields Virology* , 5th ed. Wolters Kluwer , USA ; 2007:2107.
40. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. *Cellular and Molecular Immunology* .Saunders , USA ; 2003:453.
41. Erensoy S. HIV/AIDS Tanısı ve Viral Yük Testleri. *Virolojik Tanı Yöntemleri Kursu*. 22-23 Haziran 2011. İstanbul.
42. Yılmaz G, Gürol Y. Retrovirüsler. Murray PR, Rosental KS, Pfaller MA. *Tıbbi Mikrobiyoloji kitabından*. 6.baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti. Ankara, ss 636, 2010.

43. Yılmaz G. Viral İnfeksiyonlarda Direnç: HIV .2.Türkiye Ekmud Bilimsel Platformu. Antimikrobiyal Direnç Kongre Bildiri Kitabı, ss 90-92, 11-14 Mart 2009, Ankara .
44. Türker N, Örmən B. Antiretroviral Tedavi. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) 2006; 20(3): 207–217.
45. Shafer RW and Schapiro. *Drug resistance and retroviral drug development*. J Antimicrob Chemoth 2005, 55: 817.
46. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M: Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection, Nature 373:123, 1995.
47. Abacıoğlu H. Antiretrovirallere Direnç Mekanizmaları ve Direnç Testleri.Ankem Derg 14 (No.3) :400-405, 2000.
48. Çelik, G.,Gürol, Y., Karaltı, İ., Akşacı, Ş., Öksüz, B., Yürüyen, C. ESCV 2015 Edinburg:Questionning the New CDC HIV Testing Algorithm in Search for a Cost Effective, Practical and Sensitive Algorithm in Turkey. Yeditepe University Hospital, Istanbul, TURKEY
49. Hache G, Mansky LM and Haris RS. Human APOBEC3proteins, retrovirus restriction and HIVdrug resistance. AIDSRev 2006, 8:148–57.
50. Bozdayı G. DNA Çoğaltma Yöntemleri. Tanısal Moleküler Teorik ve Uygulamalı Kursu 18-19-20 Aralık 2009, Ankara Teorik Ders Notları. 31-92.
51. Espy MJ, Uh RJ, Sloan ML, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA. Yao CDS, Wengeneck NL, Rosenblatt JE. Cockerill III RF. Smith TF. Real- Time PZR In Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clinical Microbiology Reviews. Jan.2006 p 165-256.
52. Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Etkenlere Göre İnfeksiyonlar Kitabından. 3.Baskı*. Nobel Tıp Kitabevleri : İstanbul , 1841-1870, 2008.
53. www.hivmedicine.com/textbook/testing.htm : Preiser W: HIV testing, HIV medicine s.19, 2006.
54. .Boffito M, Winston A and Owen A. *Host determinants of antiretroviral drug activity*. Curr Opinion in Inf Dis 2005, 18:543.
55. Goudsmit J, Weverling GJ, van der Hoek L et al. *Carrier rate of zidovudine resistant HIV-1: the impact of failing therapy on transmission of resistant strains*. AIDS.2001, 15:2293.
56. Saymer A. A. Anriviral Ajanlar. *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji Kitabı*. 2008 ss 255- 281.
57. World Health Organization : HIV/AIDS. The global epidemic.Wkly Epidemiol Rec 1197;72:17.

58. Ünal , S., Tümer, A. *HIV/AIDS Epidemiyolojisi ve korunma* . Ankara , Türkiye :Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi ; 1999 .
59. www.hatam.hacettepe.edu.tr (Hacettepe Üniversitesi HIV/AIDS Tedavi ve Araştırma Merkezi web sayfası (erişim tarihi 11.09.2013).
60. Bozdayı G. DNA Çoğaltma Yöntemleri. Tanısal Moleküler Teorik ve Uygulamalı Kursu 18-19-20 Aralık 2009, Ankara Teorik Ders Notları. 31-92.
61. Espy MJ, Uh RJ, Sloan ML, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA. Yao CDS, Wengeneck NL, Rosenblatt JE. Cockerill III RF. Smith TF. Real- Time PZR In Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. Jan.2006 p 165-256.
62. Vierstrate A. Principle of the PZR. 1999. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/PZR.html> Erişim tarihi 20.06.2011).
63. Temizkan, G., Arda, N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler.İstanbul,Türkiye : Nobel Tıp Kitabevleri;2004.
64. Söyletir, G., Över, U. Kemokinler ve Kemokin Reseptörleri: HIV Patogenezinde Yeni Umut.Flora Dergisi,1998 . <http://www.floradergisi.org>
65. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-7.
66. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1a, MIP-1b as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+T cells. *Science* 1995;270:1811-5.
67. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the b-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996;85:1149-58.
68. Gallo RC, Lusso P. Chemokines and HIV infection. *Curr Opin Infec Dis* 1997;10:12-7.
69. Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., et al. *Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene*.*Nature*.1996; 382(6593):722-5.
70. Schnell MJ, Johnson JE, Buonocore L, Rose JK. Construction of a novel virus that targets HIV-1 infected cells and controls HIV-1 infection. *Cell*. 1997;90:849-57.
71. Cohen J. HIV gets a taste of its own medicine. *Science* 1997;277:1606.

72. O'Brien, S.J., Moore, J.P., *The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS*. *Immunological Reviews*.2000; 177:99-111.
73. Su, B., Sun, G., Xiao, J. et al. *Distribution of three HIV-1 resistance-conferring polymorphisms (SDF1-3'A, CCR2-64I, and CCR5-Δ32) in global populations*. *European Journal of Human Genetics*.2000; 8:975–979.





YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
HASTANESİ

YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KURUL ADI	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ Devlet Yolu Ankara Cad. No: 102-104, 34752 Kozyatağı, İstanbul
TELEFON	0216 578 47 97
E-POSTA	gulin.demir@yeditepe.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sağlıklı bireylerde ki Kemokim Reseptörlerinde Meydana Gelen Gen Polimorfizmi Nedeni ile Oluşan HIV Direncin Saptanması.		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	EUDRACT NUMARASI			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Şahap Aksaçlı		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyolog		
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	YOK		
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	YOK		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Yeditepe Üniversitesi Hastanesi		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Yeditepe Üniversitesi Hastanesi		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	Tubitak'a başvuru aşamasında		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	Tubitak'a başvuru aşamasında		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input checked="" type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 <input type="checkbox"/>	FAZ 2 <input type="checkbox"/>	FAZ 3 <input type="checkbox"/>
		FAZ 4 <input type="checkbox"/>	BE/BY <input type="checkbox"/>	DİĞER <input type="checkbox"/>
	İLACI ARAŞTIRMA <input checked="" type="checkbox"/>	DİŞİ <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer ise belirtiniz: Belirtiniz:Polimorfizm çalışması.	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	
			ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>	
	ILAN	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	

YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR
FORMU

GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>
DİĞER	<input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 305	Tarih:05.03.2013
	Şahap Aksaçlı sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik bir sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurulu üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

ETİK KURULU BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kuruluş ve Çalışma Esasları.
---------------	--

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. R. Serdar ALPAN
ETİK KURULU ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
			E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. R. Serdar Alpan	Farmakoloji	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. M. Reha Cengizlier	Pediyatri	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Serdar Öztezcan	Biyokimya	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Baki Ekçi	Genel Cerrahi	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ferda Özkan	Patoloji	YÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Dr. Nural Bekiroğlu	Biyostatistik	MÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Esra Can Say	Diş Has. Ted.	YÜDF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Meriç Köksal	Eczacılık	YÜEF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ali Rıza Okur	Hukuk	YÜHF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Başar Atalay	Beyin Cerrahi	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Nesrin Sarıman	Göğüs Hastalıkları	MÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Esin Öztürk Işık	Biyomedikal Mühendisi	YÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Bilge Firuzbay	Sivil Üye/Emekli		E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* : Araştırma ile İlişki
** : Toplantıda Bulunma

Önemli Not: Çalışmanızın Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanan protokole göre yürütülmesi ve çalışma protokolündeki değişikliklerin kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.

Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı	Şahap	Soyadı	Aksaçlı
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	01.04.1983
Uyruğu	T.C	TC Kimlik No	40066533210
E-mail	sahap.aksacali@gmail.com	Tel	+90 553 030 12 00

Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora			
Yüksek Lisans			
Lisans	Biyoloji Bölümü	Çanakkale 18 Mart Üniversitesi	2006
Lise	Fen-Matematik	Özdemir Sabancı Emirgan Lisesi	2000

Bildiği Yabancı Dilleri	Yabancı Dil Sınav Notu (#)
İngilizce	60

Başarılmış birden fazla sınav varsa(KPDS, ÜDS, TOEFL; EELTS vs), tüm sonuçlar yazılmalıdır

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Biyolog	Yeditepe Üniversitesi	2011-2017
Medikal Eğitmen	Medtek A.Ş	2009-2011

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Word	Çok iyi
Excel	Çok iyi
PowerPoint	Çok iyi
Access	Çok iyi
Outlook	Çok iyi
Adobe Photoshop	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilimsel Çalışmaları

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

Çelik G., Gürol Y., Karaltı İ., Aksaçlı Ş., Öksüz B., Yürüyen C. Questionning the new CDC HIV Testing algorithm in search for a cost effective, practical and sensitive algorithm in Turkey (Meeting Abstract). Journal of Clinical Virology. 70 (2015) S123.
G.Çelik,İ.Karaltı, Y.Gürol, İÇ.Acuner, B.Öksüz, P.Özcan, Y.Öztürk, B.Ekçi, Ş.Aksaçlı, N.C.Fıçıcıoğlu, Ö.Gökçe. Results of the Retrospective Analysis of HPV Genotypes at Yeditepe University Hospital from 2008 to 2012.Virologie, Vol 17,supplement 2, S229.Eylül 2013.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

<p>20th ESCV 2017, 13-16 October 2017, Stresa-İtaly. Çelik G., Mutlacı S.I., Aksaçlı Ş., Karaltı İ., Öksüz B., Yürüyen C. In Search for a Rapid Algoritm in the Diagnosis of HIV Infection.</p>
<p>XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 3-7 Kasım 2012. Kuşadası, AYDIN Pınar Özcan, Yeşim Gürol, Baki Ekçi, Burcu Öksüz, İskender Karaltı, Şahap Aksaçlı, Yasemin Öztürk, Milena Karpiarz, Danique Ploegmarkers, Maria Johanna, N. Cem Fıçıcıoğlu, Özcan Gökçe, Gülden Çelik. 2008-2012 Yılları Arasında Yeditepe Hastanesinde Saptanan HPV Genotiplerinin Retrospektif İnceleme Sonuçları.</p>
<p>XXXVI.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 12-16 Kasım 2014,Antalya. Yeditepe Üniversitesi Hastanesine Başvuran Gebe ve Gebe Olmayan Kadınlarda Vajinal ve Rektal Sürüntü Örneklerinde Grup B Streptokok Taşıyıcılığın Araştırılması (Ön Çalışma). Y Öztürk,Ö K Yıldırım, Ö Bilgin,Z Kipritçi,D Karadeniz, B Öksüz, TŞ Gündüz, F Duman,Ş Aksaçlı, A F Korkmaz,Y Gürol, İÇ Acuner, M Birbir, R Attar, G Yıldırım, NC Fıçıcıoğlu, EÇ Kaspar, G Çelik.</p>
<p>XXXVI.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 12-16 Kasım 2014,Antalya. 2006-2014 Yılları Arasında Yeditepe Üniversitesi Hastanesinde Saptanan C.difficile Sonuçlarının Retrospektif İncelenmesi. B Öksüz, Z Kipritçi, Y Öztürk, Ş Aksaçlı, TŞ Gündüz, D Karadeniz,İ Karaltı, C Yürüyen,Y Yano,Y Gürol, İÇ Acuner, G Çelik.</p>
<p>1.Ulusal Viroloji Günleri ve Kursu, 25-28 Şubat 2016, Ankara. Dördüncü Jenerasyon Hızlı HIV Antijen Antikor testi ile Seroprevelansın Düşük Olduğu veya Bilinmediği Ülkelerde Algoritma Önerisi Çelik G, Mutlacı SI, Aksaçlı Ş, Karaltı İ, Gürol Y, Yürüyen C. İkincilik poster ödülü.</p>
<p>HIV AIDS Tedavide Yenilikler ve Altta Yatan Hastalıklar Sempozyumu 18 Şubat 2017,Ankara. HIV prevelansının düşük olduğu veya bilinmediği ülkelerde CDC'nin algoritmasına hızlı ve güvenilir seçenek. Çelik G, Mutlacı SI, Aksaçlı Ş, Karaltı İ, Gürol Y, Yürüyen C.</p>

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

<p>20th ESCV 2017, 13-16 October 2017, Stresa-İtaly. Çelik G., Mutlacı S.I., Aksaçlı Ş., Karaltı İ., Öksüz B., Yürüyen C. In Search for a Rapid Algoritm in the Diagnosis of HIV Infection.</p>
<p>Çelik G., Gürol Y., Karaltı İ., Aksaçlı Ş., Öksüz B., Yürüyen C. Questioning the new CDC HIV Testing algorithm in search for a cost effective, practical and sensitive algoritm in Turkey (Meeting Abstract). Journal of Clinical Virology. 70 (2015) S123.</p>
<p>G.Çelik,İ.Karaltı, Y.Gürol, İÇ.Acuner, B.Öksüz, P.Özcan, Y.Öztürk, B.Ekçi, Ş.Aksaçlı, N.C.Fıçıcıoğlu, Ö.Gökçe. Results of the Retrospective Analysis of HPV Genotypes at Yeditepe University Hospital from 2008 to 2012.Virologie, Vol 17,supplement 2, S229.Eylül 2013.</p>

Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifikaları/Ödülleri)

I. Ulusal Viroloji Günleri Poster Ödülü (2. lik), 2016.
Yeni Nesil PCR Uygulamalı Kursu, 2012, İstanbul.
II. Ulusal Mikoloji Günleri Düzenleme Kurulu Üyeliđi, 9-11 Eylül 2015, İstanbul.
I. HIV/AIDS Çalıştayı Düzenleme Kurulu Üyeliđi, 15-16 Ekim 2015.
ESCV Workshop "Techniques in Clinical Virology" Member of Organising Committee. 3-4 December 2015, İstanbul.
I. HIV/AIDS Çalıştayı Bildiri Kitapçığı, 2016.

