

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEPATİT C VİRÜS ENFEKSİYONLARINDA ANTI-VİRAL DİRENÇ İLE
İLİŞKİLENDİRİLMİŞ VARYANTLARIN TÜRK POPULASYONUNDA
SAPTANMASI

Esra Yurdcu

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı

Ekim

2017

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Esra Yurdcu

ONAY

Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı danışmanlığında Esra Yurdcu tarafından hazırlanan bu çalışma 25/10/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

İmza:

Üye: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

İmza:

Üye: Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Hepatit C Virüs Enfeksiyonlarında Anti-Viral Direnç ile İlişkilendirilmiş Varyantların Türk Populasyonunda Saptanması

Esra Yurdcu

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı

Hepatit C virüs enfeksiyonu tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir halk sağlığı sorunudur ve kronik HCV enfeksiyonu tedavi edilmezse karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinom riskini artmasına sebep olmaktadır. Kronik HCV enfeksiyonu tedavisinde son yıllarda önemli ilerlemeler gerçekleşmiş ve direkt etki eden antivirallerin kullanılması ile tedavi başarı oranı %90 ların üzerine çıkmıştır.

Hepatit C virüsü bir RNA virüsüdür ve viral RNA genomlarında yaklaşık 3010 aminoasitlik büyük bir poliprotein sentezler. Bu poliproteinlerin translasyon sırasında ve sonrasında selüler ve viral proteazlar tarafından işlenmesiyle yapısal olan ve yapısal olmayan proteinler üretilir. Kronik HCV enfeksiyon tedavisinde kullanılmaya başlayan direkt etki eden antiviraller, virüsün yapısal olmayan proteinlerini (NS3, NS5A, NS5B) inhibe ederek virüsün replikasyonunu engellemeyi amaçlamaktadır. HCV viral polimerazın düzeltme aktivitesinin olmaması ve yüksek replikasyon hızına sahip olması, virüs genomunda birçok aminoasit değişiminin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu aminoasit değişimlerinden bazıları, direkt etki eden antivirallerin hedeflediği, virüsün NS3, NS5A ve NS5B bölgesinde meydana gelenler, klinik açıdan önemli olan, antiviral dirence sebep olmaktadır. Bu tezin amacı, Türkiye'deki farklı HCV genotiplerine (1a, 1b, 2, 3, 4) sahip, daha önce DAA tedavisi almamış hastalarda HCV'nin NS3, NS5A ve NS5B bölgelerindeki dirençle ilgili olarak belirlenmiş aminoasit değişikliklerinin incelenmesidir.

Çalışmada daha önce DAA tedavisi almamış, farklı genotiplerde (1b, 1a, 2, 3, 4) toplam 285 hastanın serum örneklerinden elde edilen HCV RNA'nın NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinin *dideoxy sanger sequencing* yöntemi ile DNA dizi analizi yapıldı. Bu bölgelerde, dirençle ilgili olarak belirlenmiş aminoasit noktalarındaki nükleotit ve aminoasit değişiklikleri incelendi.

Yapılan dizi analizi sonucunda HCV'nin NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinde toplamda 285 hastada bakılan 48 adet dirençle ilgili aminoasit değişikliğinden 21 tanesi görülmüştür.

2017, 101 sayfa

Anahtar kelimeler: Hepatit C virüs, direkt etki eden antiviraller, antiviral direnç, direnç varyantı

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Detection of Variants Associated with Anti-Viral Resistance in Hepatitis C Virus Infection
in Turkish Population

Esra Yurdcu

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. A. Mithat Bozdayı

Hepatitis C virüs (HCV) infection is a major public health problem all over the world and in our country and if chronic HCV infection is not treated, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma risk increase. Significant progress has been made in the treatment of chronic HCV infection in recent years and the success rate of treatment has increased to over 90% by using direct acting antivirals

Hepatitis C virüs is an RNA virüs and synthesizes a large polyprotein of about 3010 amino acids in viral RNA genomes. These polyproteins are processed by cellular and viral proteases during and after translation to produce nonstructural proteins and structural proteins. Direct acting antivirals, which are used in the treatment of chronic HCV infection, aim to inhibit virus replication by inhibiting the nonstructural proteins of the virus (NS3, NS5A, NS5B). The lack of corrective activity of the HCV viral polymerase and its high replication rate cause many amino acid exchanges to occur in the virus genome. Some of these amino acid changes are caused by antiviral resistance, which is important for clinically important, viruses targeting NS3, NS5A and NS5B regions, which are targeted by direct acting antivirals. The aim of this thesis is to examine the changes in the amino acid changes of HCV in NS3, NS5A and NS5B regions in patients with different HCV genotypes (1a, 1b, 2, 3, 4) in Turkey who have not previously been treated with DAA.

In the study, DNA sequence analysis was performed by dideoxy sanger sequencing of NS3, NS5A and NS5B regions of HCV RNA obtained from serum samples of 285 patients in different genotypes (1b, 1a, 2, 3, 4) that had not previously received DAA therapy. In these regions, nucleotide and amino acid changes at indicated amino acid sites related to resistance were examined.

As a result of the sequence analysis, 21 out of 48 resistance-related amino acid changes observed in a total of 285 patients in NS3, NS5Ave NS5B regions of HCV.

2017, 101 pages

Keywords: Hepatit C virus, directly acting antivirals, antiviral resistance, resistance variant

TEŞEKKÜR

Bana Hepatoloji laboratuvarında çalışma firsatı veren değerli danıŐmanım PROF. DR. A. MİTHAT BOZDAYI'ya,

Tez aŐamasında bana gosterdikleri destek ve sabırları için AİLEME,

Eğlenceli ve huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan tım HEPATOLOJİ ENSTİTÜŐÜ alıŐanlarına,

Tez alıŐmamı 17B0207001 numaralı proje kapsamında desteklediği için Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP),

Güzel arkadaŐlıęı ve desteği için GÜNİZ CENGİZ'e teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. HEPATİT C VİRÜSÜ GENOM YAPISI	2
2.2. HEPATİT C VİRAL PROTEİNLER	2
2.2.1. YAPISAL PROTEİNLER	3
2.2.2. YAPISAL OLMAYAN PROTEİNLER	3
2.3. HCV HAYAT DÖNGÜSÜ VE REPLİKASYONU	4
2.4. HCV GENOTİPLERİ VE COĞRAFİK DAĞILIMI.....	5
2.5. KRONİK HEPATİT C ENFEKSİYONU	6
2.6. HCV ENFEKSİYONUNUN TEDAVİSİ	7
2.6.1. KRONİK HCV ENFEKSİYONU TEDAVİSİNDE DİREKT ETKİ EDEN ANTİVİRALLER VE DİRENÇ MUTASYONLARI	8
2.6.1.1. NS3-Proteaz İnhibitörleri.....	12

2.6.1.2. NS5A İnhibitörleri	14
2.6.1.3. NS5B İnhibitörleri	15
<u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u>	17
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	19
4.1. MATERYAL	19
4.1.1. HASTA SERUMLARI	19
4.1.2. KİMYASALLAR	19
4.1.3. KİTLER VE ENZİMLER	20
4.1.4. CİHAZLAR	20
4.1.5. STANDART TAMPON VE ÇÖZELTİLER	21
4.1.6. PRİMERLER.....	21
YÖNTEM	25
4.1.7. HASTA SERUMUNDAN VİRAL RNA EKSTRAKSİYONU.....	25
4.1.8. CDNA SENTEZİ	25
4.1.9. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR).....	26
4.1.10. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ.....	33
4.1.11. PZR ÜRÜNLERİNİN SİLİKA İLE TEMİZLENMESİ.....	34
4.1.12. PZR ÖRNEKLERİN ÖLÇÜLMESİ	34
4.1.13. SEKANS PZR.....	34
4.1.14. SEKANS PZR ÜRÜNLERİNİN TEMİZLENMESİ	35
4.1.15. ÖRNEKLERİN CİHAZA YÜKLENMESİ	35
4.1.16. SEKANS ANALİZİ.....	36
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	37
5.1. PZR ÖRNEKLERİN JEL GÖRÜNTÜLERİ	37

5.2. DNA DİZİ ANALİZİ.....	43
5.2.1. NS3 BÖLGESİ ANALİZ SONUÇLARI	43
5.2.2. NS5A BÖLGESİ ANALİZ SONUÇLARI	53
5.2.3. NS5B BÖLGESİ ANALİZ SONUÇLARI.....	57
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>70</u>
<u>7. KAYNAKLAR</u>	<u>76</u>
<u>8. EKLER.....</u>	<u>82</u>
<u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>85</u>
<u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>86</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.HCV virion yapısı ((2)'den değiştirilmiştir)	2
Şekil 2.2. HCV genom organizasyonu	3
Şekil 2.3. HCV hayat döngüsünün şematik çizimi ((23)'den değiştirilmiştir)	5
Şekil 2.4. HCV genotip ve alttiplerinin dünyadaki coğrafik dağılımı (sınıflandırılmış sekanslar diğerleri olarak gösterilmiştir) (32)	6
Şekil 2.5. HCV hayat döngüsü ve hedefleri	8
Şekil 2.6. HCV tedavisinde kullanılan DAA'lar	9
Şekil 3.1 Virüs inhibasyonu sırasında meydana gelen birincil ve ikincil direnç mutasyonları	17
Şekil 5.1. HCV genotip 1b 1-16 arasındaki hastaların NS3 bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	39
Şekil 5.2. HCV genotip 4 1-20 arasındaki hastaların NS3 bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	39
Şekil 5.3. HCV genotip 1b 1-30 arasındaki hastaların NS5A bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	40
Şekil 5.4. HCV genotip 1a 1-18 arasındaki hastaların NS5A bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	41
Şekil 5.5. HCV genotip 2 1-36 arasındaki hastalarının NS5B bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 5.6. HCV genotip 1b 1-18 arasındaki hastalarının NS5B bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	43

Şekil 5.7. HCV genotip 1b'ye ait NS3 bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS3 bölgesinin 16., 36., 39., 41., 43., 54., 55., 56. aminoasit noktalarını göstermektedir	44
Şekil 5.8. HCV genotip 1b'ye ait NS3 bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS3 bölgesinin 80., 109., 122. aminoasit noktalarını göstermektedir	45
Şekil 5.9. HCV genotip 1b'ye ait NS3 bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS3 bölgesinin 132., 138., 155., 156., 158., 168., 170., 175. aminoasit noktalarını göstermektedir.....	46
Şekil 5.10. HCV genotip 1b NS3 bölgesine ait örneklerin Mega6 programı kullanılarak karşılaştırılması. Siyah oklar sırasıyla NS3 bölgesi 36., 39., 41., 43 , 54., 55., 56. aminoasit noktalarını göstermektedir.....	47
Şekil 5.11. HCV genotip 1b'ye ait NS5A bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5A bölgesinin 28., 30., 31., 32. aminoasit noktalarını göstermektedir	53
Şekil 5.12. HCV genotip 1b'ye ait NS5A bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5A bölgesinin 54., 58., 93. aminoasit noktalarını göstermektedir	54
Şekil 5.13. HCV genotip 1b NS5A bölgesine ait örneklerin Mega6 programı kullanılarak karşılaştırılması. Siyah oklar sırasıyla NS5A bölgesi 28., 30., 31., 32. aminoasit noktalarını göstermektedir	55
Şekil 5.14. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5B bölgesinin 95., 96., 142. aminoasit noktalarını göstermektedir....	58
Şekil 5.15. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halka NS5B bölgesinin 223. aminoasit noktasını göstermektedir.....	58
Şekil 5.16. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5B bölgesinin 282., 316., 321. aminoasit noktalarını göstermektedir	59

Şekil 5.17. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5B bölgesinin 365., 368., 414. aminoasit noktalarını göstermektedir	60
Şekil 5.18. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5B bölgesinin 419., 423., 424., 426., 448. aminoasit noktalarını göstermektedir.....	61
Şekil 5.19. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5B bölgesinin 482., 494., 495., 496., 499. aminoasit noktalarını göstermektedir.....	62
Şekil 5.20. HCV genotip 1b NS5B bölgesine ait örneklerin Mega6 programı kullanılarak karşılaştırılması. Siyah oklar sırasıyla NS5B bölgesi 419., 423., 424., 426. aminoasit noktalarını göstermektedir.....	63
Şekil 6.1 Tedavi görmemiş HCV 1b ile enfekte hastalarda NS5A polimorfizimlerin görülme oranı.....	71
Şekil 6.2 Türkiye'de NS3 bölgesindeki dirençle ilgili aminoasit noktalarının görülme oranları.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. HCV NS3, NS5A ve NS5B bölgelerindeki RASs	10
Çizelge 2.2. HCV NS3 bölgesindeki RASs (48).....	13
Çizelge 2.3 HCV NS5A bölgesindeki RASs (48,66).....	14
Çizelge 2.4 HCV NS5B bölgesindeki RASs (48,55,68)	15
Çizelge 4.1 Kullanılan tampon ve çözeltiler	21
Çizelge 4.2 Kullanılan primerler	22
Çizelge 5.1 Genotiplere göre PZR ile çoğaltılan hasta sayıları.....	37
Çizelge 5.2 PZR ürün uzunlukları (baz çifti olarak)	38
Çizelge 5.3 HCV 1b, 1a, 2, 3, 4 genotiplerinde, NS3-proteaz bölgesindeki dirençle ilgili pozisyonlardaki aminoasitlerin görülme sıklığı	48
Çizelge 5.4 HCV 1b ve 1a genotiplerinde NS5A bölgesindeki dirençle ilgili pozisyonlardaki aminoasitlerin görülme sıklığı	56
Çizelge 5.5 HCV 1b, 1a, 2, 3, 4 genotiplerinde NS5B-polimeraz bölgesindeki dirençle ilgili pozisyonlardaki aminoasitlerin görülme sıklığı	64

SİMGELER DİZİNİ

μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
bç	Baz çifti
C	Kor bölgesi
cDNA	Komplementer DNA
DAAs	Direkt etki eden antiviraller
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit
HCV	Hepatit C virüsü
IRES	“İnternal ribosome entry site”
IU	Uluslararası birim
kDA	Kilodalton
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NI	Nükleotit inhibitörleri
NNI	Nükleotit inhibitörü olmayan
NS	Yapısal olmayan
ORF	Açık okuma çerçevesi
PI	Proteaz inhibitörü
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RASs	Dirençle ilgili aminoasit yer değişikliği

RAVs	Dirençle ilgili varyantlar
RdRp	RNA bağımlı RNA polimeraz
RNA	Ribonükleik asit
sn	Saniye
SVR	Sürdürülebilir viral cevap
U	Ünite/ birim
UTR	Translasyona uğramayan bölge
WHO	Dünya sağlık örgütü



1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünyada 71 milyon insanın kronik Hepatit C virüs enfeksiyonuna sahip olduğu bilinmektedir ve bunların önemli bir kısmı ilerde karaciğer kanseri ve karaciğer fibrozisine sahip olacağı öngörülmektedir. Her yıl yaklaşık olarak 399 000 insan HCV ile bağlantılı karaciğer hastalıklarından ölmektedir (1).

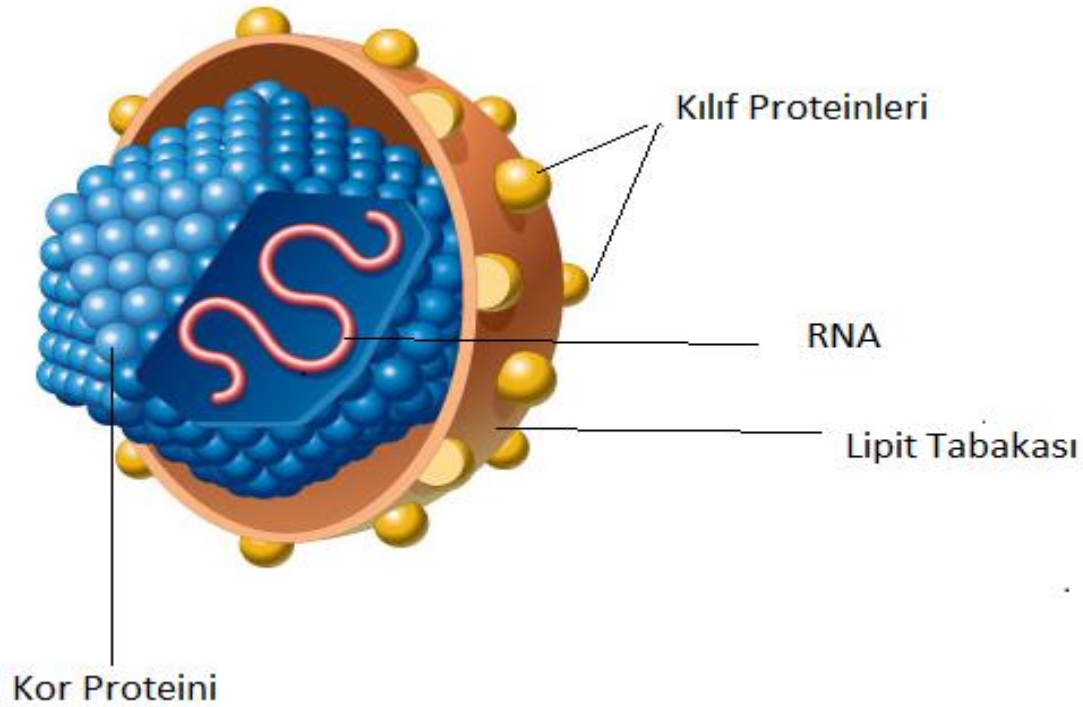
Kronik Hepatit C virüs enfeksiyonunun tedavisi, virüsün konak canlıdan tamamen yok edilmesiyle başarılıdır. Bu amaçla son yıllarda virüsün replikasyonunu engelleyen '*direct acting antiviraller*' (DAAs) kullanılmaya başlanmıştır. DAA'ların kullanılmaya başlanmasıyla kronik Hepatit C virüs enfeksiyonunun tedavisinde oldukça önemli adımlar atılmış ve tedavi başarı oranı %95'lere ulaşmıştır. Kronik HCV enfeksiyonunda oluşan direnç varyantları tedavinin önündeki en büyük engellerdendir. Son yıllarda kullanılan antivirallere karşı dirençli olduğu belirlenmiş varyantların tespiti ve bu direnç noktalarındaki aminoasitlerin fenotiplendirilmesi oldukça önemlidir.

Bu tez ile kronik Hepatit C tedavisinde kullanılan DAA'ların ana hedefleri arasında bulunan virüsün NS3, NS5A ve NS5B bölgelerindeki dirence sebep olarak belirlenmiş direnç varyantları ve aminoasit değişikliklerinin prevalansını, Türkiye'deki farklı HCV genotipli (1a, 1b, 2, 3, 4) hastalarda belirlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. HEPATİT C VİRÜSÜ GENOM YAPISI

HCV 1989 yılında keşfedilmiştir. Hepatit C virüsü *Flaviviridae* ailesinin *Hepacivirus* sınıfına ait bir virüstür. En dışta konak hücrenin çift katmanlı lipit tabakası bulunur ve kılıf proteinleri taşır. Lipit tabakasının altında genomik RNA'yı çevreleyen ve çok sayıda kor proteinlerinden meydana gelen nükleokapsit yapısı bulunur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1.HCV virion yapısı ((2)'den değiştirilmiştir)

Hepatit C virüs genomu 9,6 kb lık pozitif tek zincir bir RNA genomundan oluşmaktadır. Bu genom 5'-3' UTR (*untranslated region*) bölgeleri ile çevrilmiş yaklaşık 3010 aminoasitlik bir poliprotein sentezleyen bir açık okuma çerçevesinden (ORF) oluşur. 5'UTR bölgesi 341 baz, 3'UTR bölgesi ise yaklaşık 225 baz uzunluğundadır ve protein translasyonu ve replikasyon için yüksek derecede korunmuş yapıdadırlar (3).

2.2. HEPATİT C VİRAL PROTEİNLER

HCV genotiplere göre değişen 9024-9111 arasında nükleotit içeren bir açık okuma çerçevesine sahiptir (4). Bu açık okuma çerçevesinden yaklaşık olarak 3010 aminoasitlik

bir poliprotein sentezlenir. Bu poliproteinlerin işlenmesiyle yapısal olan ve yapısal olmayan 10 adet viral protein oluşur. Bu proteinlerden Kor (Core-C), E1 ve E2 olmak üzere 3 tanesi yapısal, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B olmak üzere 7 tanesi de yapısal olmayan proteinlerdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. HCV genom organizasyonu

2.2.1. YAPISAL PROTEİNLER

Kor (C) proteinlerinin asıl görevinin virüs nükleokapsit proteini olmasının yanı sıra RNA bağlama, bağışıklık, hücre sinyal yolları, tümör oluşumu ve apoptozda rol oynamak gibi önemli görevleri de bulunmaktadır. Kor proteini ayrıca HCV birleşiminde yer alan lipid damlacığı ile de ilişkilidir (5). Moleküler ağırlığı 23kDa dur.

E1-E2 Proteinleri, Glikolize zarf proteinleridir ve viral parçacıklar ile çevrelenmiştir. HCV zarfının esas bileşeni olan bu proteinler virüsün hücreye girişini sağlamaktadır (6,7). Moleküler ağırlıkları sırasıyla yaklaşık olarak 33-70 kDa dur.

2.2.2. YAPISAL OLMAYAN PROTEİNLER

p7, küçük bir iyon kanalı görevi gören bu protein 63 aminoasitten oluşan bir poliproteindir. Viral parçacıkların olgunlaşması ve salınımında görev yapmaktadır (5).

NS2 proteini, NS3 proteininin amino-terminal kısmı ile birlikte NS2-3 sistein proteaz olarak diğer proteinlerin işlenmesinde görev alırlar.

NS3 proteinin N-terminal kısmı serin proteaz olarak görev yaparken, C-terminal kısmı RNA helikaz/NTPaz olarak görev almaktadır.

NS4A, NS3 proteaz aktivitesinin kofaktörüdür. NS3-4A bölgesi HCV enfeksiyonunun patogenezi ve virüsün yaşam döngüsünde önemli bir protein olduğu için tedavide kullanılan bir antiviral ilaç hedefidir.

NS4B proteinin yapısı henüz tam olarak bilinmemesine rağmen viral membran parçalarının oluşumunda görev aldığı bilinmektedir.

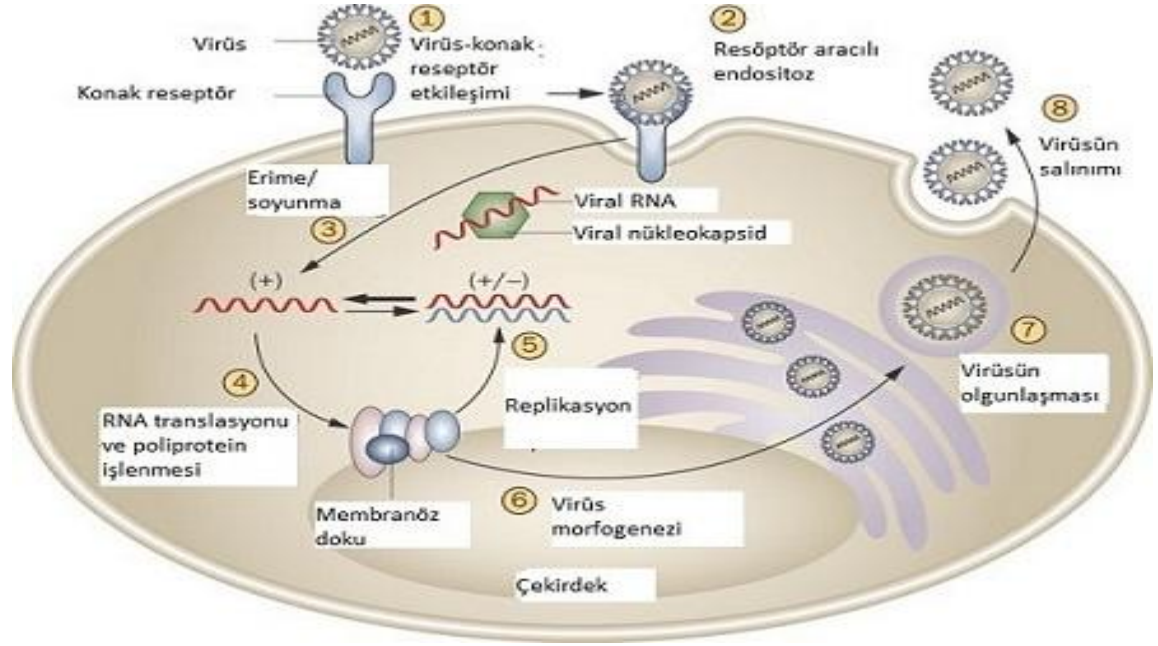
NS5A proteini virüsün replikasyonu ve hücresel sinyal yollarında önemli olduğu bilinmemektedir.

NS5B proteini ise RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enzimi olarak eksi zincirli RNA'dan artı zincirli RNA oluşumuna sağlayarak virüsün çoğalmasını sağlar.

2.3. HCV HAYAT DÖNGÜSÜ VE REPLİKASYONU

HCV hayat döngüsü diğer pozitif tek zincir RNA virüsleriyle benzerdir. Şekil 2.3'de görüldüğü gibi **1-HCV'nin** hücre yüzeyine bağlanması ve girişi karmaşık bir aşamadır ve burada etkili birçok faktör bulunmaktadır. Virüsün hücre yüzeyine tutunmasında virüsün E1 ve E2 zarf glikoproteinleri virüsle ilgili faktörler arasındadır (8). Konak hücreyle ilgili faktörle arasında ise CD81 (9), LDL reseptörü (10), SR-BI (11), DC-SIGN/L-SIGN (11,12), yüksek oranda sülfatlanmış heparin sülfat (13), claudin-1 (CLDN1) (14), occludin (OCLN) (15,16) gibi hücre yüzey reseptörleri bulunur. **2-Diğer *Flaviviridae* ailesinin** üyelerinde olduğu gibi HCV'de de virüsün hücreye bağlanması endositoza yol açar (17) ve hücre içerisine giriş endostoz ile olur. **3-Resöptör** aracılı endositoz ile hücre içerisine giren virüsün nükleokapsit yapısı asidik pH ortamına bağlı olarak erir ve RNA genomu sitoplazmaya salınır (4,18,19). **4-Pozitif zincir RNA'dan** endoplazmik retikulumda 5' UTR bölgesinde IRES (*internal ribosome entry site*) kontrolü altında protein translasyonu başlar. Translasyon ile yaklaşık 3000 aminoasitlik bir polipeptid sentezlenir. Bu proteinlerin sinyal peptidaz gibi selüler ve NS2, NS3/4A viral proteazlar tarafından işlenmesiyle olgun HCV proteinleri oluşur. **5-Proteinlerin işlenmesi** süresince lipit damlacıkları, HCV RNA, ER (endoplazmik retikulum) membranı ve HCV'nin yapısal olmayan proteinlerini içeren çift zarlı kesecikler membranımsı ağ (*membranous web*) yapısını oluşturmaktadır (4,20,21). HCV replikasyonunun bu membranımsı ağ da meydana geldiği bilinmektedir. Pozitif zincir RNA'dan negatif zincir oluşumunda IRES dışında

5'UTR'nin diğer dizileri görev almaktadır. Ortamda bulunan negatif zincir kalıp olarak kullanılarak, RdRp enzimi tarafından yeni pozitif zincir RNA oluşturulur. Yeni oluşan pozitif zincirler translasyon ile poliprotein ve daha sonrada olgun HCV proteinlerini oluşturur. **6**-Yeni sentezlenen RNA molekülü nükleokapsit içinde paketlenir ve tomurcuklanarak endoplazmik retikluma doğru salınır. **7-8**-HCV'nin paketlenmesi ve hücreden salınması tam olarak bilinmemekle birlikte lipit metabolizmasıyla yakın ilişkilidir (22).



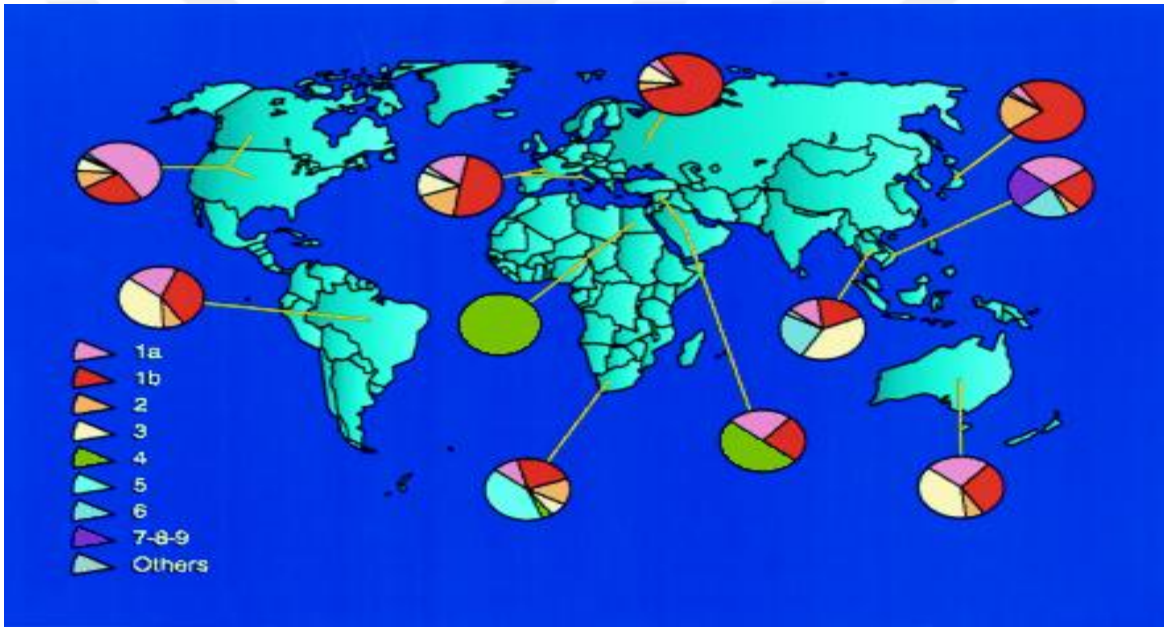
Şekil 2.3. HCV hayat döngüsünün şematik çizimi ((23)'den değiştirilmiştir)

2.4. HCV GENOTİPLERİ VE COĞRAFİK DAĞILIMI

Hepatit C virüs replikasyonunun yüksek kapasiteye sahip olması ve tamir mekanizmasına sahip olmaması virüsde genomik olarak çeşitliliğe, heterojenite (*quasispecies*) oluşmasını sağlar. Bu heterojenite de farklı genotiplerin oluşmasına sebep olmaktadır. HCV, viral genomun sekansı ve filogenetik analizi baz alındığında tanımlanmış 7 genotip olarak sınıflandırılır (24). Bu genotipler arasında virüsün tamamı göz önüne alındığında ortalama %30-35 oranında farklılık vardır. Bu 7 genotip de nükleotit noktaları göz önüne alındığında <%15 oranında farklı bulunan, 67 adet onaylı ve 20 adet şüanda onaylı olmayan alt tiplere ayrılmıştır (25). HCV genotiplendirilmesinde birçok yöntem bulunmasına rağmen en sık kullanılan yöntem direkt sekanslama yöntemidir. Bu yöntem ile HCV'nin bir bölgesi (NS5, Kor, E1, 5'UTR bölgeleri) polimeraz zincir reaksiyonu

(PZR) ile çoğaltılıp doğrudan dizi analizi yapılarak genotipe karar verilir (25,26). Bu dizilerin filogenetik analizi de genotiplendirmede sıklıkla kullanılır (24).

Şekil 2.4'de görüldüğü gibi HCV genotip 1a ve 1b Avrupa'da (27-29) ve Amerika'da (30) en baskın genotiplerdir. HCV 1b genotipi Japonya'daki HCV enfeksiyonunun %73'ünden sorumludur (31). HCV 2a ve 2b kuzey Amerika ve Avrupa'da bulunurken, 2c genotipi kuzey İtalya'da sıklıkla görülmektedir (32). 3a genotipi Avrupa ve Amerika'da intravenöz ilaç bağımlıları arasında yaygın şekilde görülmektedir (33). Genotip 4 kuzey Afrika ve Ortadoğu'da sıklıkla görülürken (34,35), genotip 5 güney Afrika'da, genotip 6'da Honkong ve güneydoğu Asya'da sıklıkla görülmektedir (36). Genotip 7 ise Kanada'da orta Afrikalı bir göçmende tespit edilmiştir (37).



Şekil 2.4. HCV genotip ve alttiplerinin dünyadaki coğrafik dağılımı (sınıflandırılmış sekanslar değerleri olarak gösterilmiştir) (32)

2.5. KRONİK HEPATİT C ENFEKSİYONU

HCV enfeksiyonu önemli bir halk sağlığı sorunudur. Günümüzde dünyada 71 milyon insanın kronik HCV enfeksiyonuna sahip olduğu bilinmektedir. Kronik HCV enfeksiyon tanısı koymak için iki aşama vardır, birincisi anti-HCV antikorlarının serolojik test ile tespit edilmesidir. İkinci aşama ise, eğer serolojik test pozitif çıkarsa, hastaların doğrudan HCV RNA ölçümü yapılmasıdır. Her iki test de pozitif çıkan hastalara kronik HCV tanısı konmaktadır. Serolojik HCV antikor testi pozitif çıkan hastaların %15-45'inde, güçlü bir

bağışıklığa sahip olmalarından dolayı, herhangi bir tedavi almadan ve HCV enfeksiyonu kronikleşmeden ortadan kalkmaktadır. HCV'nin inkübasyon süresi 2-6 haftadır. HCV enfeksiyonunun başlangıcında hastaların %80'inde herhangi bir semptom görülmemektedir. Semptom görülenlerde ise, ateş, yorgunluk, iştah azalması, bulantı, kusma, karın ağrısı, gri renk dışkı, koyu renk idrar, eklem ağrısı ve sarılık görülebilmektedir (1).

2.6. HCV ENFEKSİYONUNUN TEDAVİSİ

Kronik HCV enfeksiyon tedavisinde ilk hedef enfeksiyonu tedavi etmektir. Bunun içinde sürdürülebilir viral cevabı (*sustained viral response*, SVR) sağlamak gerekmektedir. SRV, tedavi tamamlandıktan 12 veya 24 hafta sonra hastadaki HCV RNA'nın tespit edilmemesi olarak tanımlanmaktadır. SVR başarılan hastaların %99'undan daha fazlasında enfeksiyon tedavi edilmiştir (38). Hepatit C virüsü karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinoma ya sebep olan ana unsurdur (39,40). Kronik HCV tedavisinde asıl amaç virüsün tamamen ortadan kalkmasını sağlayarak siroz ve hapatoselüler karsinoma oluşmasını engellemektir.

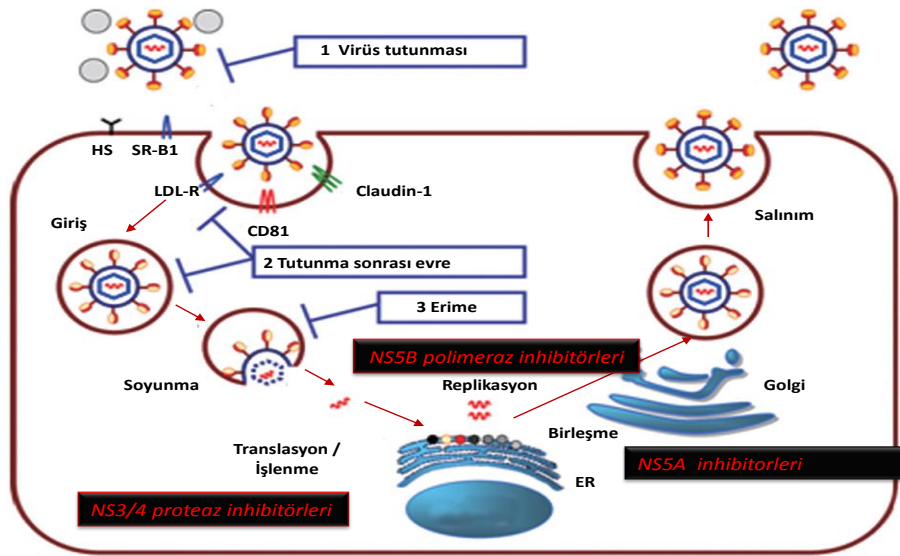
Kronik HCV enfeksiyon tedavisinde virüs ve hastayla ilgili faktörlerde bulunmaktadır. Hastayla ilgili faktörler arasında hastanın IL-28B gen polimorfizmi ve siroza sahip olup olmaması sayılırken, virüsle ilgili faktörler olarak da virüsün hangi genotipe sahip olduğu, ilaçlara karşı herhangi bir direnç mutasyonu içerip içermediği ya da viral yük miktarının ne olduğunu sayabiliriz. İlaç-ilaç etkileşiminin olmaması, yan etkilerinin olmaması ve antiviral ilaçlara karşı yüksek genetik bariyere sahip olmaması tedaviyi etkileyen ilaçla ilgili faktörler arasında sayabiliriz.

Kronik HCV enfeksiyonu tedavisinde interferon (IFN) tekli tedavisine ribavirinin eklenmesiyle SVR tekli tedaviye oranla %20 artmıştır (41). Daha sonra interferonun pegilasyonu ile oluşan pegile interferon (pegIFN) kullanılmaya başlanmıştır. PegIFN'nin kullanılması interferona kıyasla SVR oranında %10-15 oranında artışa sebep olmuştur (42,43). 2011 yılına kadar pegIFN+ribavirin, HCV'nin standart tedavisi olarak 24 veya 48 hafta boyunca kullanılmaktaydı (44). Bu tedavi protokolünün HCV genotip 1 ile enfekte hastalarda ki SVR oranı kuzey Amerika'da yaklaşık olarak %40 iken, batı Avrupa'da %50 civarındadır. HCV genotip 2, 3, 5 ve 6 da SVR oranları %80'lerin üzerine çıkarken genotip 4 de daha orta seviyede SVR sağlanmaktadır (45). Bu standart tedavinin yan etkilerinin

çok olması (46,47) ve yan etkilerin hastalar tarafından tolere edilememesi, ayrıca tedavi başarı oranının düşük olması yeni ilaç geliştirilmesi için çalışmaların başlamasına sebep olmuştur. Bu yeni geliştirilen ilaçlar direkt etki eden antiviraller (DAAs) olarak adlandırılmaktadır. Kronik HCV enfeksiyonunda tedavinin değişim sürecine baktığımızda, SVR, IFN α tekli tedavisinde %15-20 oranından DAA'ların kullanılmasıyla %90 oranının üstüne yükselmiştir.

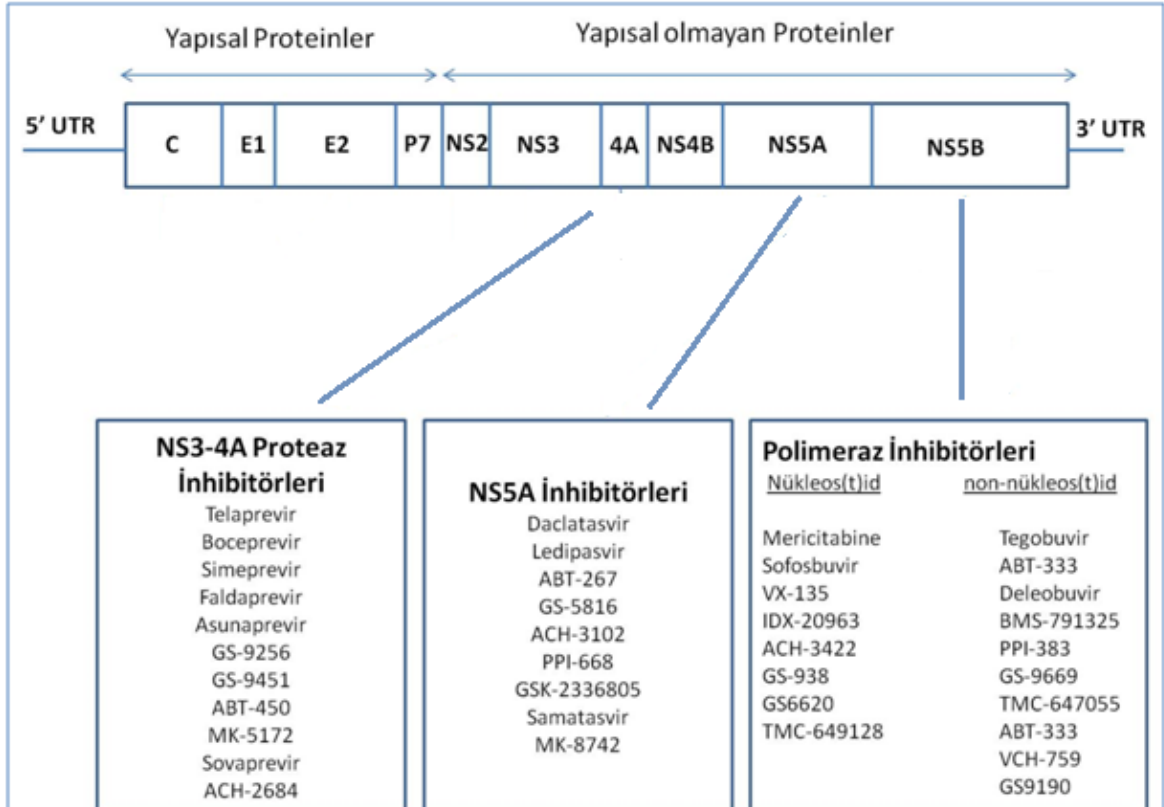
2.6.1. KRONİK HCV ENFEKSİYONU TEDAVİSİNDE DİREKT ETKİ EDEN ANTİVİRALLER VE DİRENÇ MUTASYONLARI

DAA'ların etki mekanizması genel olarak virüsün çoğalmasını engelleyerek virüsün tamamen ortadan kalkmasını sağlamaktır. Bu amaçla da DAA'ların esas hedefleri arasında virüsün yapısal olmayan ve replikasyonda görevli olan NS3, NS5A ve NS5B proteinleri bulunur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. HCV hayat döngüsü ve hedefleri

Kronik HCV enfeksiyonu tedavisinde kullanılan bazı DAA'lar Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. HCV tedavisinde kullanılan DAA'lar

Dirençle ilgili yer değişimi (RASs), antiviral ilaçlara karşı virüsün duyarlılığında azalmaya sebep olan viral proteindeki aminoasit değişiklikleri için kullanılırken, dirençle ilgili varyant terimi (RAVs), bir ya da daha fazla dirençle ilgili yer değişimi (RASs) içeren virüsün genetik varyantını tanımlarken kullanılmaktadır.

HCV yüksek bir hücre döngüsüne sahiptir ve yarı ömrü tahmini olarak sadece 2-5 saattir: enfekte bir hastada her gün 10^{10} - 10^{12} virüs üretilmekte ve temizlenmektedir (48,49). Yüksek replikasyon hızına sahip HCV'nin ayrıca replikasyon sırasında RdRp enziminin doğrulama mekanizmasına sahip olmaması virüsün gen havuzunda çok sayıda viral varyantın oluşmasına sebep olmaktadır. Bu viral varyantların bir kısmı konak immün sistemi tarafından temizlenmekte veya protein kodlama bölgesindeki hatalardan dolayı replike olamamaktadır (50,51). Fakat çok sayıda varyant hayatta kalarak kronik enfeksiyon oluşturmaktadır. Bu varyantların oluşumuna virüsün genomundaki aminoasit değişiklikleri sebep olmaktadır. Bu aminoasit değişikliklerinden kronik HCV enfeksiyonu tedavisinde kullanılan DAA'ların hedef bölgesi olan, virüsün yapısal olmayan 3, 5A ve 5B bölgesinde meydana gelenlerinin antiviral tedavi süresince seçimleri ilaç direnci oluşturabilmektedir.

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla belirlenmiş, kronik HCV enfeksiyon tedavisinde kullanılan DAA'lara karşı farklı derecelerde direnç sebep olan RASs Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. HCV NS3, NS5A ve NS5B bölgelerindeki RASs

Antiviral Hedefler	Dirençle İlgili Aminoasit Değişiklikleri	Referans
NS3	C16 S	(52)
	V36 M/A/G/C	(53)
	A39 V	(54)
	Q41 R	(52)
	F43 I/L/S/V	(53)
	T54 A/S	(53)
	V55 A	(53)
	Y56 H	(53)
	Q80 R/K	(53)
	R109 K	(52)
	S122 R	(53)
	I132V	(48)
	S138 T	(52)
	R155 K/Q/I/M/G/L/S	(53)
	A156 F/N/S/T/V	(53)
	V158 I	(53)
	D168 G/V/E/H/T/Y	(53)
V170 A	(53)	
M175 L	(53)	

Çizelge 2.1 (devam)

NS5B	H95 Q	(52)
	S96 T	(53)
	N142 T	(52)
	L159 F	(55)
	C223 H	(53)
	S282T	(53)
	C316 Y/H/N	(53)
	L320 F	(55)
	V321 I	(53)
	S365 T/A	(53)
	S368 T	(53)
	M414 T/I/V/L	(53)
	L419 M/V	(53)
	M423 T/I/V	(53)
	I424 V	(56)
	M426 T	(52)
	Y448 C/H	(53)
	I482 L/V/T	(53)
	V494 S/Q/L/A/T	(53)
	P495 S/Q/L/A/T	(53)
P496 A/S	(53)	
V499 A	(53)	

Çizelge 2.1 (devam)

NS5A	M28 T/A/G/V	(53)
	Q30 E/R/H/L/T	(53)
	L31 M/V/I/F	(53)
	P32 L	(57)
	H54 Y	(53)
	H58 P	(53)
	Y93 C/N/F/H/S	(53)

2.6.1.1. NS3-Proteaz İnhibitörleri

NS3 proteini 631 aminoasitten oluşur ve serin proteaz ve helikaz olarak iki enzimatik aktiviteye sahiptir. Bu proteini hedefleyen DAA'lar, proteaz inhibitörleri (PI) olarak isimlendirilirler. Proteaz inhibitörleri, viral proteinlerin proteolitik ayrılmasını inhibe ederek viral RNA replikasyonunu baskılamayı amaçlamaktadır.

2011 yılında onaylanan ve kronik HCV enfeksiyon tedavisinde ilk olarak kullanılan birinci nesil DAA'lar NS3 proteaz inhibitörü olan Boceprevir ve Telaprevirdir. Bu DAA'lar düşük genetik bariyere sahip olduğu için yapılan çalışmalar, HCV genotip 1 ile enfekte hastalarda, bu antivirallerin tek başına değil de pegIFN α +ribavirinle birlikte kullanılmasının daha etkili olduğunu göstermiştir (58). Birçok zehirlenme olaylarına karşılık bu tedavi rejimin HCV genotip 1b ile enfekte hasta gruplarında yaklaşık olarak %75 SVR oranına ulaşılmıştır (59,60). Telaprevir/Boceprevir'den sonra kullanılmaya başlanan proteaz inhibitörü Simeprevirdir. Simeprevirin pegIFN+Ribavirin ile birlikte kullanıldığı tedavi, Telaprevir/Boceprevir'li rejime kıyasla daha yüksek SVR oranına sahiptir (61). Paritaprevir, Vaniprevir ve Grazoprevir diğer proteaz inhibitörleridir. Proteaz inhibitörlerinin diğer grup DAA'lar ile birlikte kullanımını kronik HCV tedavisinde, SVR oranını %90' lardan daha yukarı çıkarmıştır (62). Kronik HCV tedavisinde kullanılan NS3 proteaz inhibitörü olarak kullanılan antiviraller ve bu antivirallere karşı dirençle ilgili olarak belirlenmiş aminoasit değişiklikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. HCV NS3 bölgesindeki RASs (48)

DAAs	Genotip 1a	Genotip 1b
Boceprevir	V36M T54S R155K	T54S V55A A156S V170A
Telaprevir	I132V	V36M+R155K R155G/K/M/T V36M+R155K A156F/N/S/T/V
Simeprevir	Q80K Q80K+R155K R155K D168A	Q80H/K/R Q80K/R+R155K Q80H+D168E Q80R+D168A/E S122R R155K A156G/V D168A/E/H/I/T/V/Y
Paritaprevir	V36M V36M+R155K Y56H+D168V R155K D168A/E/V/Y	V36M+R155K Y56H+D168V D168A/K/V Y56H+D168V
Vaniprevir	R155K	A156G D168V

2.6.1.2. NS5A İnhibitörleri

NS5A proteini 458 aminoasitten oluşur ve bilinen bir enzimatik aktivitesi yoktur. NS5A proteininin HCV replikasyonu ve viral olgunlaşmada görev aldığı ve çeşitli hücresel proteinler ile etkileşim halinde olduğu bilinmektedir (63).

NS5A inhibitörleri *pan*-genotipik bir özelliğe sahiptir, yani HCV genotiplerinin hepsinde etki ederken, antiviral etkisi bir genotipten diğerine göre farklılık göstermektedir (64). NS5A proteinini hedefleyen ilk DAA Daclatasvir'dir. Daclatasvir HCV genotip 1 üzerinde yüksek bir antiviral etkiye sahiptir, özellikle genotip 1a ile kıyaslandığında genotip 1b de daha etkilidir. Diğer bir NS5A inhibitörü olan Ledipasvir *in vitro* olarak genotip 1a, 1b, 4a ve 5a da oldukça yüksek bir antiviral etkiye sahipken, 2a ve 3a genotiplerinde düşük bir etkiye sahiptir (65). Ombitasvir, Elbasvir, Velpatasvir, NS5A inhibitörü olarak kullanılan diğer antivirallerdir. Kronik HCV tedavisinde kullanılan NS5A inhibitörü olarak kullanılan antiviraller ve bu antivirallere karşı dirençle ilgili olarak belirlenmiş aminoasit değişiklikleri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3 HCV NS5A bölgesindeki RASs (48,66)

DAAs	Genotip 1a	Genotip 1b
Daclatasvir	M28T	L31M/V
	Q30E/H/R	L31M/V+Y93H
	L31M/V	Y93H
	Y93C/H/N	H58P
Ledipasvir	M28T	
	Q30E/H/R	
	Q30R+Y93C	
	L31M	
	H58D	
	Y93C/H/N	

Çizelge 2.3 (devam)

Ombitasvir	M28T/V	Y93H
	Q30R	
	H58D	
	Y93C/H/N	

2.6.1.3. NS5B İnhibitörleri

NS5B proteini, RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) enzimi olarak, viral RNA'nın negatif zincirinden pozitif zincir oluşmasını sağlamaktadır. Bu protein düzeltme (proofreading) aktivitesine sahip olmaması virüsün genetik heterojenite oluşturmaya neden olur.

NS5B inhibitörleri iki guruba ayrılmaktadır. Birincisi viral replikasyonda NS5B polimerazın substratını taklit ederek yeni oluşan viral genomu girip zincir uzamasını sonlandıran nükleotit analoglarıdır (NI). Diğeri ise viral polimerazda yapısal değişikliklere sebep olarak replikasyonu engelleyen non-nükleotit analoglarıdır (NNI). Sofosbuvir bir nükleotit analogudur ve birçok klinik çalışmada yüksek oranda SVR oranına sahiptir. Ayrıca çok yüksek genetik direnç bariyerine sahiptir. Dasabuvir, Baclabuvir gibi NS5B'yi hedefleyen non-nükleotit grubundaki DAA'lardır. NNI grubundaki antiviraller NI ile kıyaslandığında antiviral etkileri daha sınırlıdır (67). Kronik HCV tedavisinde kullanılan NS5B polimeraz inhibitörü olarak kullanılan antiviraller ve bu antivirallere karşı dirençle ilgili olarak belirlenmiş aminoasit değişiklikleri Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4 HCV NS5B bölgesindeki RASs (48,55,68)

DAAs	Genotip 1a	Genotip 1b	Genotip 2a-2b
Sofosbuvir	L159F	L159F	L159F
	S282T/R	S282T	S282T
	L320F		
Dasabuvir	C316Y	C316Y	
	M414I/T		
	Y448H		

Çizelge 2.4 (devam)

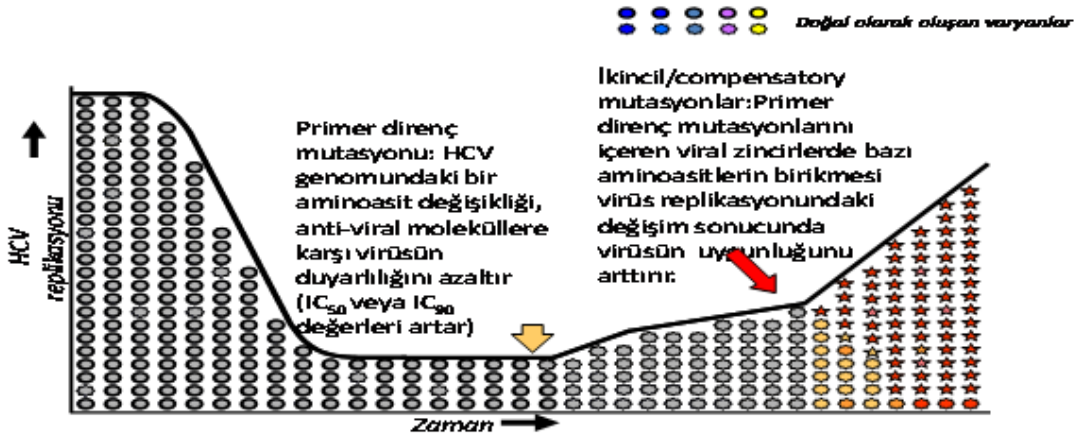
Baclabuvir	P495A/L/S		
-------------------	-----------	--	--



3. GEREKÇE VE AMAÇ

Hepatit C virüsünün yüksek replikasyon oranına sahip olması RdRp enziminin düzeltme aktivitesine sahip olması virüsün çok çeşitli bir genetik heterojenite oluşmasına sebep olmaktadır.

Kronik HCV enfeksiyon tedavisinde, virüs replikasyonunun baskılanması sırasında HCV genomundaki bir aminoasit değişimi kullanılan anti-viral moleküle karşı virüsün duyarlılığında azalmaya sebep olur (**birinci-primer direnç mutasyonu**). Anti-viral tedavinin devam etmesi seçilmiş mutasyonun baskın hale gelmesinde sebep olur ve primer direnç mutasyonlarını içeren viral zincirdeki bazı aminoasitlerin birikmesi, virüs replikasyonundaki değişim sonucunda virüsün uygunluğunu artırır (**ikincil direnç mutasyonu**) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Virüs inhibasyonu sırasında meydana gelen birincil ve ikincil direnç mutasyonları Kronik HCV tedavisinde son yıllarda DAA'ların kullanılmaya başlanması ile sürdürülebilir viral yanıt oranları %90'ların üzerine çıkmıştır. DAA'lar virüsün replikasyonda görev olan NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinin hedeflemektedir. DAA'ların hedefledikleri bu bölgelerde meydana gelen birincil ve ikincil direnç mutasyonuna sebep olan bazı aminoasit değişimleri tedavi başarısızlığına sebep olabilmektedir. Bu tezde Türkiye'deki DAA tedavisi almamış hastalarda dirence sebep olan bu aminoasit

noktalarının incelenmesi amaçlanmıştır. Elde ettiğimiz veriler Türkiye'deki hasta profilinin ortaya çıkmasında oldukça önemli olacaktır.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. HASTA SERUMLARI

Bu tez çalışmasına Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesine başvuran HCV RNA'sı pozitif (HCV RNA miktarı 10^3 IU/ml ve yukarı) ve daha önce DAA tedavisi almamış hastalar dahil edilmiştir. 09.11.2015 tarihli 17-713-15 karar no'lu etik kurul izni alınmıştır. Hastaların HCV genotiplendirilmesi NS5B gen bölgesi sekanslarına göre yapılmıştır. Çalışmaya toplam 285 hasta dahil edilmiştir ve bunların 147'si HCV genotip 1b, 30'u HCV genotip 1a, 32'si genotip 2, 18'i genotip 3 ve 58'i genotip 4 e sahiptir. Bu hastaların plazma örnekleri çalışmaya başlayıncaya kadar -80°C 'de saklanmıştır.

4.1.2. KİMYASALLAR

Çalışmada kullanılan bütün kimyasallar, alındığı firmalar ve katalog numaraları aşağıda belirtilmiştir.

Agaroz	Sigma, ABD, A9539
EDTA	Quantum, ABD, EDTA23
Etidyum Bromür	Sigma, ABD, E8751
NaOAc	Sigma, ABD, S2889
Formamid	Applied biosystems, UK, 4311320
GSCN	Applichem, Almanya, A1107
Tris	Vivantis, ABD, PR0612
Asetik Asit	Riedel-de Haen, Almanya, 60 000 20
Silika	Sigma, ABD, S5631
HCl	Merch, Almanya, 314

Etil Alkol %99,5	Kimetsan, Türkiye, KIM EL/01 EP
Bromofenol Mavisi	Sigma, Almanya, B6896
Ksilen Siyanol	Sigma, Almanya, X4126
Fikol	Biochrom, Almanya, F4375

4.1.3. KİTLER VE ENZİMLER

Kullanılan kit ve enzimlerin marka, üretim yeri ve katalog numaraları aşağıda verilmiştir.

High Pure Viral RNA Kit	Roche, Almanya, 11858882001
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Almanya, 04897030001
Taq DNA Polimeraz	Thermo, Litvanya, EP0402
dNTP Set	Thermo, Litvanya, R0181
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, ABD, 4337455
NanoPOP4	ABI, ABD, NP4-102
310 Running Buffer (10X) with EDTA	Thermo, ABD, 402824

4.1.4. CİHAZLAR

Çalışmada kullanılan cihazlar ve marka, modeli aşağıda verilmiştir.

Laminar Kabin	clanLAF, CB 1204
Distile Su Cihazı	GFL, 2002
Hassas Terazı	Sartorius, BP 110S
Jel Elektroferez Cihazı	Major Science, MP 300V
Jel Görüntüleme Sistemi	UV Transilluminator, UVP
Kuru Blok	Techne DRI BLOCK, DB 2D

Nanodrop 1000 Spektrofotometrisi	ACTGene, ASP-2680
pH metre	Mettler Toledo, MP 220
Thermal Cycler PZR Cihazı	ABI, 2720 Thermal Cycler
Santrifüj Cihazı	Hettich Zentrifugen, Mikro 200R
Vorteks Cihazı	Thermo Scientific, LP Vortex Mixer
Genetik Analiz Cihazı	ABI Prism, 310 Genetic Analyzer

4.1.5. STANDART TAMPON VE ÇÖZELTİLER

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltiler Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Kullanılan tampon ve çözeltiler

Standart Tampon ve Çözelti	İçerik
TAE Tamponu (10X)	48,4 gr Trisbase, 20 ml 0.5 M pH 8 EDTA, 11,42 ml Glacial Asetik asit, dH ₂ O ile 1000ml’ye tamamlandı.
Agaroz Jel Yükleme Tamponu (6X)	% 15 Fikol, %0,05 Bromofenol mavisi, %0,05 Ksilen siyanol
Sodyum Asetat (NaOAc) Çözeltisi	50 ml dH ₂ O, 20,415 gr, 19 ml asetik asit(pH 4.6’ya ayarlanır)
Silika Solüsyonu	35,4 gr GSCN, 0,12 gr Tris, 0,5 gr Silika, 50µl HCL

4.1.6. PRİMERLER

Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2: Kullanılan primerler

Primerler	DNA Dizisi 5'→3'	Referans
NS5B 1 FWD 8008-8032	CTA CCA TCA TGG CTA ARA AYG AGG T	(69)
NS5B 1 REV 8673-8697	ATG ATG TTA TGA GCT CCA RGT CRT A	(69)
NS5B 2 FWD 8256-8276	TAT GAY ACC CGC TGY TTT GAC	(69)
NS5B 2 REV 8616-8636	CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA	(69)
5B FWD	GGA GCC KGG RGA TCC RGA TCT YAG C	(66)
5BREV	GTT GGG GAG GAG GTA GAT GCC TA	(66)
5B 4 FWD	GAY GTC GTG TGC TGC TCR ATG TC	(66)
5B 4 REV	GAG ACA CGC TGT GAT AAA TGT CTC CC	(66)
M13 F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	(70)

Çizelge 4.2 (devam)

M13 R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	(70)
NS3ALL F2	M13 F-ATG GAR AYY AAG VTY ATY ACX TGG G	(70)
NS3ALL R1	M13 R-CTY TTX CCR CTX CCX GTX GGX GCR TG	(70)
2nd NS3ALL F3	M13 F-ATC TTX CTX GGX CCX GCY GA	(70)
2nd NS3ALL R2	M13 R-GCX ACY TGR TAX GTX TGX GG	(70)
NS3 1 FWD	ATC ACS TGG GGR GCR GAY AC	(71)
NS3 1 REV	AAY TTG CCR TAK GTG GAG TAY GT	(71)
NS3 2 FWD	ACS GCR GCR TGY GGG GAC AT	(71)
NS3 2 REV	GTG CTC TTR CCG CTR CCR GT	(71)
EF 1B	TGG ATG AAC CGG CTG ATA G	(72)
ER 1B	CCA CAR GAG GTT GGC CTC	(72)

Çizelge 4.2 (devam)

IF 1B	TCC CCC ACG CAC TAC GTG	(72)
IR 1B	CTA GCY GAR GAG CTG GCC	(72)
EF 1A	GTT GGC CCG GGC GAG GG	(72)
ER 1A	CGC CCA TCT CCT GCC TCC A	(72)
IF 1A	TCC CCC ACG CAC TAC GTG	(72)
IR 1A	GTG CAA GTT GCC TGG AGA GA	(72)



YÖNTEM

4.1.7. HASTA SERUMUNDAN VİRAL RNA EKSTRAKSİYONU

Serumdan HCV RNA izolasyonu Laminar kabin içerisinde, üretici firmanın "High Pure Viral RNA" (Roche) kiti içerisinde bulunan talimatlara göre yapıldı:

- 200 µl serum örneği, 4µl poli A içeren 200 µl bağlama tamponu (binding buffer) ile bir ependorf tüpüne konulur.
- İyiçe karıştırılır (Thermo, LP vortex, Kore) ve filtreli tüpe (high pure filter) aktarılır.
- 11000 rpm'de 15 saniye santrifüj (Hettich ,Micro 200R, Almanya) edilir.
- Filtreden geçen sıvı atılır ve filtreli kolon 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon (inhibitör removal buffer) eklenir.
- 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Filtreden geçen sıvı atılır ve filtreli kolon 450 µl yıkama tamponu (wash buffer) eklenir.
- 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- 6. ve 7. basamaklar 2 kez tekrarlanır.
- 10 saniye 15000 rpm'de santrifüj edilir.
- Filtreli kolon 1,5 ml'lik steril ependorf tüpüne aktarılır ve 50 µl elüsyon tamponu (elution buffer) eklenir.
- 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA elde edilir.

Elde ettiğimiz viral RNA eğer o gün çalışacaksa +4°C'de, daha sonra çalışılacak ise -20°C ya da -80°C'de muhafaza edildi.

4.1.8. CDNA SENTEZİ

Serumdan elde edilen RNA üretici firmanın "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche) talimatlarına göre yapıldı:

❖ RNA primer karışımının hazırlanması

- Ekstrakte edilmiş 1µg (10 µl) viral RNA 0,2 ml'lik PZR tüpüne eklenir.
- 2 µl random hexamer (600µM) solüsyonu eklenir.
- 1 µl H₂O eklenir.
- Yavaşça karıştırılır ve kısaca döndürerek çöktürülür.

- 65°C 'de 10 dakika inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrası buzda bekletilir.
- ❖ **Transkripsiyon karışımının hazırlanması**
- Steril 1,5 ml'lik ependorf tüpüne 4 µl transkriptor reaksiyon buffer (5X) eklenir.
- 2 µl dNTP karışımı (10mM) eklenir.
- 0,5 µl protector RNAase inhibitör (40U/µl) eklenir.
- 0,5 µl transcriptor reverse transkriptaz (20U/µl) eklenir.
- Yavaşça karıştırılır ve kısaca döndürülerek çöktürülür
- ❖ 7 µl olan RNA- primer karışımını içeren tüpe 13 µl Transkripsiyon karışımından eklenir ve Thermal cyler PZR (applied biosystems,2720 thermal cyler, Singapur) cihazına aşağıdaki sıcaklık ve döngüde konulur.

25°C 10 dk

55°C 30 dk

85°C 5 dk

4.1.9. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

Elde edilen cDNA'dan NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinin PZR ile çoğaltılması aşağıdaki aşamalar izlenerek yapıldı. PZR, 0,2 µl'lik tüplerde (Neptune,Mexico) ve "Applied Biosystems, 2720 Thermal Cyler" cihazında yapıldı.

NS3 bölgesinin amplifikasyonu

HCV genotip 1b ve 1a için

Reaksiyon karışımı 1.tur

Primer NS3ALL F2 (10µM)	2µl
Primer NS3ALL R1 (10µM)	2µl
MgCl ₂ 25mM)	3 µl
dNTP (2mM)	5 µl

Taq buffer (10X)	5 µl
Taq DNA Polimeraz (500U/100µL)	0,5µl
DNA	50 ng
ddH ₂ O	27,5µl

Reaksiyon Şartları 1.tur

94°C	3 dk	
94°C	15 sn	} 45 döngü
53°C	1 dk	
72°C	1 dk	

Reaksiyon karışımı 2.tur

Primer 2nd NS3ALL F3 (10µM)	2 µl
Primer 2nd NS3ALL R2 (10µM)	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Taq buffer (10X)	5 µl
Taq DNA Polimeraz (500U/100µL)	0,5 µl
DNA	50 ng
ddH ₂ O	27,5µl

Reaksiyon Şartları 2.tur

94°C	5 dk	
94°C	30 sn	} 5 döngü
53°C	1 dk	
72°C	1 dk	
94°C	15 sn	} 35 döngü
67°C	30 sn	
72°C	30 sn	

HCV genotip 2, 3, 4 için

Reaksiyon Karışımı 1.tur/ 2.tur

Primer NS3 1FWD (10µM)/ NS3 2FWD (10µM)	2 µl
Primer NS3 1REW (10µM)/ NS3 2REW (10µM)	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Taq buffer (10X)	5 µl
Taq DNA Polimeraz (500U/100µL)	0,5 µl
DNA	50 ng
ddH ₂ O	27,5 µl

Reaksiyon şartları

1.tur için

95°C	5 dk	
95°C	30 sn	} 40 döngü
50°C	30 sn	
72°C	2 dk	
72°C	7 dk	

2.tur için

95°C	5 dk	
95°C	30 sn	} 40 döngü
56°C	30 sn	
72°C	1 dk	
72°C	7 dk	

NS5A bölgesinin amplifikasyonu

HCV genotip 1b için

Reaksiyon Karışımı 1.tur/ 2.tur

Primer EF1B (10µM)/ IF1B (10µM)	2µl
Primer ER1B (10µM)/ IR1B (10µM)	2µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Taq buffer (10X)	5 µl

Taq DNA Polimeraz (500U/100µL)	0,5 µl
DNA	50 ng
ddH ₂ O	27,5µl

Reaksiyon şartları 1.tur/ 2.tur

94°C	3 dk	
94°C	35 sn	} 45 döngü
54°C	35 sn	
72°C	1,5 dk	
72	10 dk	

HCV genotip 1a için

Reaksiyon Karışımı 1.tur/ 2.tur

Primer EF1A (10µM)/ IF1A (10µM)	2µl
Primer ER1A(10µM)/ IR1A (10µM)	2µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Taq buffer (10X)	5 µl
Taq DNA Polimeraz (500U/100µL)	0,5 µl
DNA	50 ng
ddH ₂ O	27,5 µl

Reaksiyon Şartları 1.tur/ 2.tur

94°C	3 dk	
94°C	35 sn	} 45 döngü
54°C	35 sn	
72°C	1,5 dk	
72°C	10 dk	

NS5B bölgesinin amplifikasyonu

HCV genotip 1b için

Reaksiyon Karışımı 1.tur/ 2.tur

Primer 5B FWD (10µM)/ 5B 4FWD (10µM)	2 µl
Primer 5B REV (10µM)/ 5B 4 REV (10µM)	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Taq buffer (10X)	5 µl
Taq DNA Polimeraz (500U/100µL)	0,5 µl
DNA	50 ng
ddH ₂ O	27,5 µl

Reaksiyon Şartları

1.tur

95°C 5 dk

95°C 30 sn }
60°C 1 dk } 40 döngü
68°C 2 dk }

68 °C 10 dk

2.tur

95°C 5 dk

95°C 30 sn }
60°C 1 dk } 40 döngü
72°C 2 dk }

72 °C 10 dk

HCV genotip 1a, 2, 3, 4 için

Reaksiyon Karışımı 1.tur/ 2.tur

Primer NS5B 1FWD (10µM)/ NS5B 2FWD (10µM)	2 µl
Primer NS5B 1REV (10µM)/ NS5B 2REV (10µM)	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Taq buffer (10X)	5 µl
Taq DNA Polimeraz (500U/100µL)	0,5 µl

DNA	50 ng
ddH ₂ O	27,5 µl

Reaksiyon Şartları

1.tur

95°C	5 dk	
95°C	30 sn	} 40 döngü
50°C	30 sn	
72°C	2 dk	
72°C	7 dk	

2.tur

95°C	5 dk	
95°C	30 sn	} 40 döngü
55°C	30 sn	
72°C	1,5 dk	
72°C	7 dk	

4.1.10. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

PZR ürünleri, agaroz jel elektroforez yöntemiyle aşağıdaki işlemler takip edilerek görüntülendi.

- 1.5 gr agaroz, 75 ml 1X TAE tamponuyla (%2'lik) karıştırılır.
- Mikrodalga da agaroz eriyene kadar ısıtılır (ortalama 1-2 dk).
- Mikrodalgadan çıkarılır ve soğuması için bekletilir.
- 1-2 µl etidyum bromür eklenir.

- Tarak jel tabağına yerleştirilir ve jel dökülür.
- Jel donduğunda (ortalama 30-60 dk) tarak çıkarılır ve jelin üstünü kaplayacak miktarda 1X TAE tamponu ilave edilir.
- 5 µl PZR amplifikasyon ürünü, 1 µl yükleme tamponu (boyası) ile karıştırılır ve kuyucuklara yüklenir.
- 100 V'da 30 dakika yürütülür.
- U.V ışık altında DNA bantları görüntülenir.

4.1.11. PZR ÜRÜNLERİNİN SİLİKA İLE TEMİZLENMESİ

- Her bir PZR ürününün üzerine 50µl silika solüsyonu eklenir
- 1 dakika 4600 rpm'de santrifüj edilir.
- Üst kısımdaki süpernatant atılır.
- 50 µl %70'lik etil alkol eklenir.
- 1 dakika 4600 rpm'de santrifüj edilir.
- Üst kısımdaki süpernatant atılır.
- 50 µl H₂O eklenir ve karıştırılır.
- Tüplerin kapakları açık olacak şekilde 15 dakika 72°C'de bekletilir.
- 1 dakika 4600 rpm'de santrifüj edilir.
- Eğer o gün çalışılmayacak ise +4°C'de bekletilebilir.

4.1.12. PZR ÖRNEKLERİN ÖLÇÜLMESİ

DNA yoğunluğu ACTGene spektrofotometre (ASP-2680) cihazı kullanılarak ölçüldü. Cihaza 1 µl PZR örneği yüklenerek ölçüm yapıldı.

4.1.13. SEKANS PZR

Sekans PZR için ileri(forward) ve geri (reverse) primer ile çift yönlü sekans PZR yapıldı (Çizelge 4.2). Sanger sekanslama tekniği ile DNA dizi analizi yapılacak olan bölgenin PZR reaksiyon içeriği ve şartları aşağıdaki gibidir.

Reaksiyon Karışımı

Primer (3,2 µM)	1µl
Sekans buffer (5X)	1,75 µl
Big Dye Kit	0,5 µl
DNA	0,5-4 µl(toplam hacimde 10 ng olacak şekilde)
ddH ₂ O	toplam hacim 10 µl'ye tamamlanır.

Reaksiyon Şartları

94°C	1 dk	} 25 döngü
94°C	10 sn	
50°C	5 sn	
60°C	4 dk	

4.1.14. SEKANS PZR ÜRÜNLERİNİN TEMİZLENMESİ

- Sekans PZR ürünlerinin üzerine 1 µl NaOAc ve 25 µl %99,5'lik etil alkol eklenir.
- Karıştırılır ve 10 dakika oda ısısında bekletilir.
- 4600 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
- Üst kısımdaki sıvı süpernatant atılır.
- 35 µl %70'lik etil alkol eklenir.
- 4600 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Üst kısımdaki sıvı süpernatant kısmı atılır.
- 20 µl formamid eklenir ve karıştırılır.
- Cihaza hemen yükleme yapılmayacak ise -20°C'de muhafaza edilir.

4.1.15. ÖRNEKLERİN CİHAZA YÜKLENMESİ

Örneklerin DNA dizi analizi için "ABI 310 Genetic Analyzer" (Perkin Emler, Foster City, USA) cihazı kullanıldı.

4.1.16. SEKANS ANALİZİ

Cihazdan alınan DNA fragmentleri verileri Finch TV Version 1.4.0 ve MEGA6 programı kullanılarak analiz edildi.



5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. PZR ÖRNEKLERİN JEL GÖRÜNTÜLERİ

Çalışmaya alınan HCV pozitif 147 adet genotip 1b, 30 adet genotip 1a, 32 adet genotip 2, 18 adet genotip 3 ve 58 adet genotip 4 olan hastadan HCV RNA izole edilmiş ve ters transkripsiyon ile cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'dan çoğaltılmak istenen bölgeye göre 1 ve 2.tur PZR'ları yapılmış ve %2'lik agaroz jelde 50 b.ç. lik marker kullanılarak yürütülmüştür. Çalışmaya alınan HCV pozitif hasta sayıları ve yapılan deney sonucunda PZR ile çoğaltılabilen hasta sayıları Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çizelge 5.1 Genotiplere göre PZR ile çoğaltılan hasta sayıları

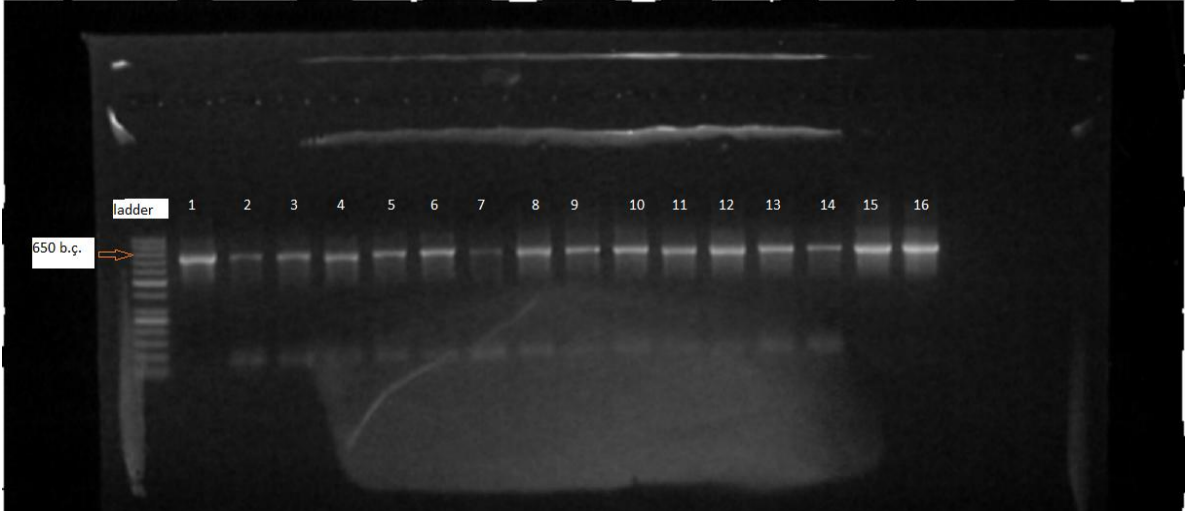
Hasta sayısı	NS3	NS5A	NS5B
Genotip 1b 147 adet	143	129	82
Genotip 1a 30 adet	30	24	29
Genotip 2 32 adet	28	çoğaltılamadı	32
Genotip 3 18 adet	18	çoğaltılamadı	16
Genotip 4 58 adet	43	çoğaltılamadı	58

Çalışmadaki hasta örneklerinin HCV NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinin PZR ile çoğaltılması sonucunda elde edilen dizilerinin fragment uzunlukları b.ç. (baz çifti) olarak Çizelge 5.2'de verilmiştir.

Çizelge 5.2 PZR ürün uzunlukları (baz çifti olarak)

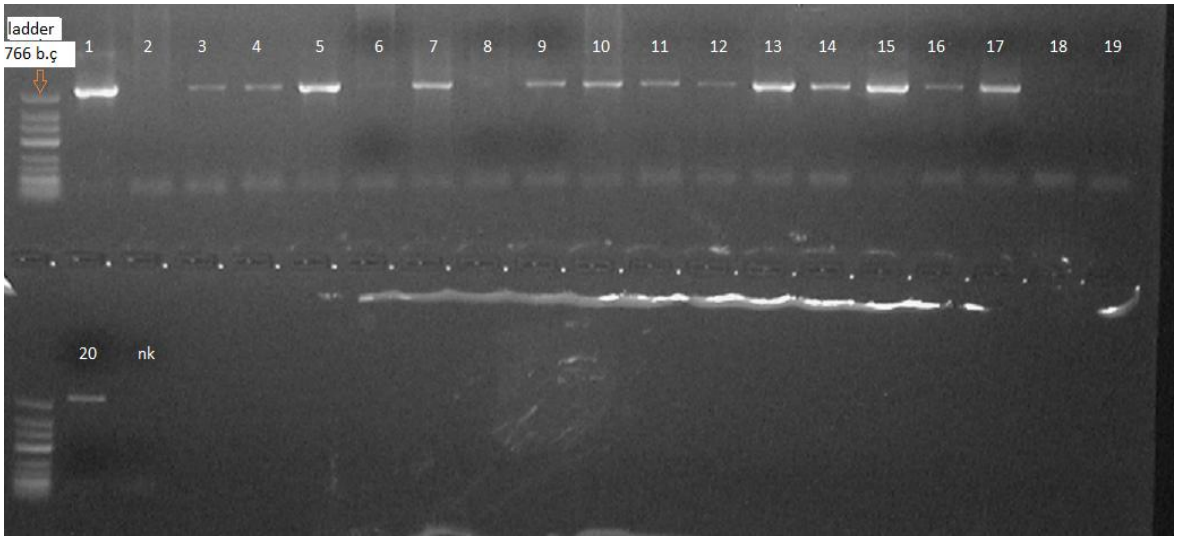
HCV Genotip	NS3	NS5A	NS5B
Genotip 1b	650 b.ç.	824 b.ç.	1712 b.ç.
Genotip 1a	650 b.ç.	854 b.ç.	381 b.ç.
Genotip 2	745b.ç.	Çoğaltılmadı	381 b.ç.
Genotip 3	745 b.ç.	Çoğaltılmadı	381 b.ç.
Genotip 4	745 b.ç.	Çoğaltılmadı	381 b.ç.

Çalışmaya alınan HCV genotip 1b'ye sahip olan hastalardan elde edilen HCV'nin NS3 bölgesinin PZR ile çoğaltıldıktan sonra %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve jel görüntüsü Şekil 5.1'de verilmiştir. Jel görüntüsünde birinci kuyucuk 50 b.ç. lik DNA belirtecini gösterirken 1-16 numara ile belirtilmiş kuyucuklardaki örnekler 650 b.ç. uzunluğunda HCV genotip 1b'nin NS3 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda pozitif çıkan hastaları göstermektedir.



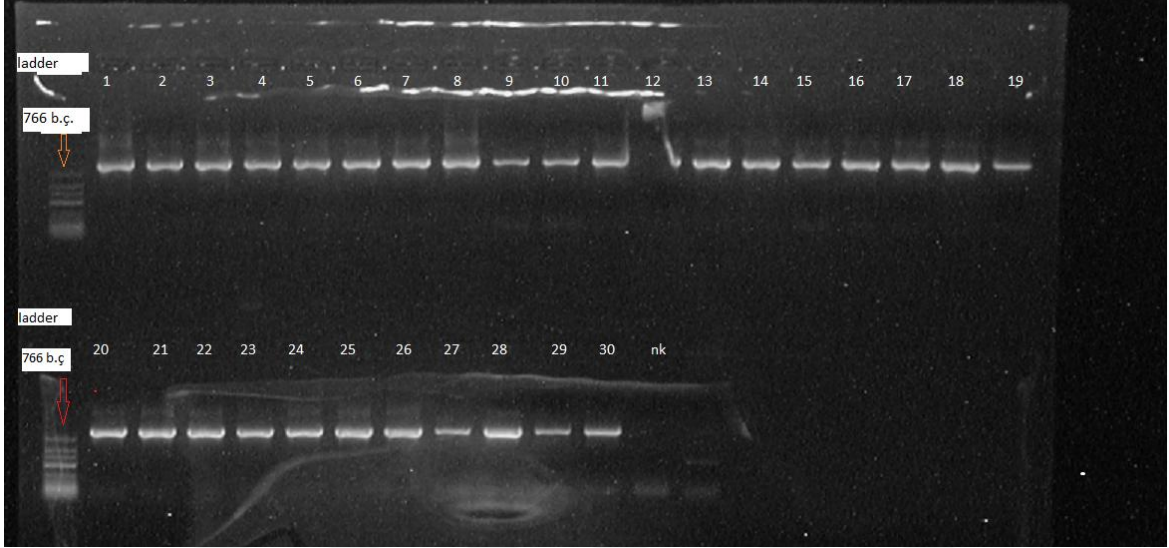
Şekil 5.1. HCV genotip 1b 1-16 arasındaki hastaların NS3 bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü

Çalışmaya alınan HCV genotip 4'e sahip olan hastalardan elde edilen HCV'nin NS3 bölgesinin PZR ile çoğaltıldıktan sonra %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve jel görüntüsü Şekil 5.2'de verilmiştir. Jel görüntüsünde birinci kuyucuk düşük moleküler ağırlıklı DNA belirtecini gösterirken 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20 numaralı kuyucuklar 745 b.ç. uzunluğunda HCV genotip 4'ün NS3 bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda pozitif çıkan hastaları gösterirken 2, 6, 8, 18, 19 numaralı kuyucuklardaki örneklerde çoğalma görülmemiştir. nk ise negatif kontrolü göstermektedir.



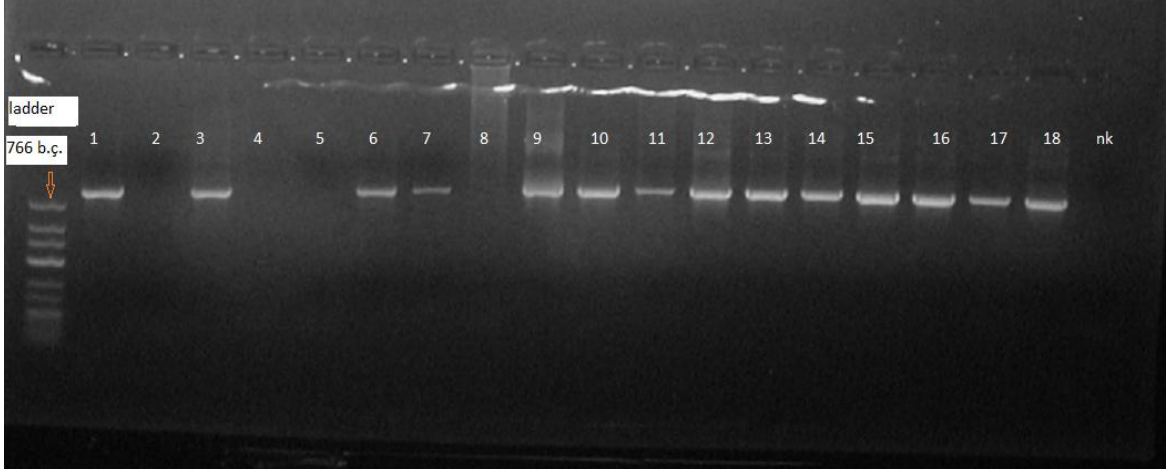
Şekil 5.2. HCV genotip 4 1-20 arasındaki hastaların NS3 bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü

Çalışmaya alınan HCV genotip 1b'ye sahip olan hastalardan elde edilen HCV'nin NS5A bölgesinin PZR ile çoğaltıldıktan sonra %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve jel görüntüsü Şekil 5.3'de verilmiştir. Jel görüntüsünde birinci kuyucuk düşük moleküler ağırlıklı DNA belirtecini gösterirken 1-30 numara ile belirtilmiş kuyucuklardaki örnekler 824 b.ç. uzunluğunda HCV genotip 1b'nin NS5A bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda pozitif çıkan hastaları göstermektedir. nk ise negatif kontrolü göstermektedir.



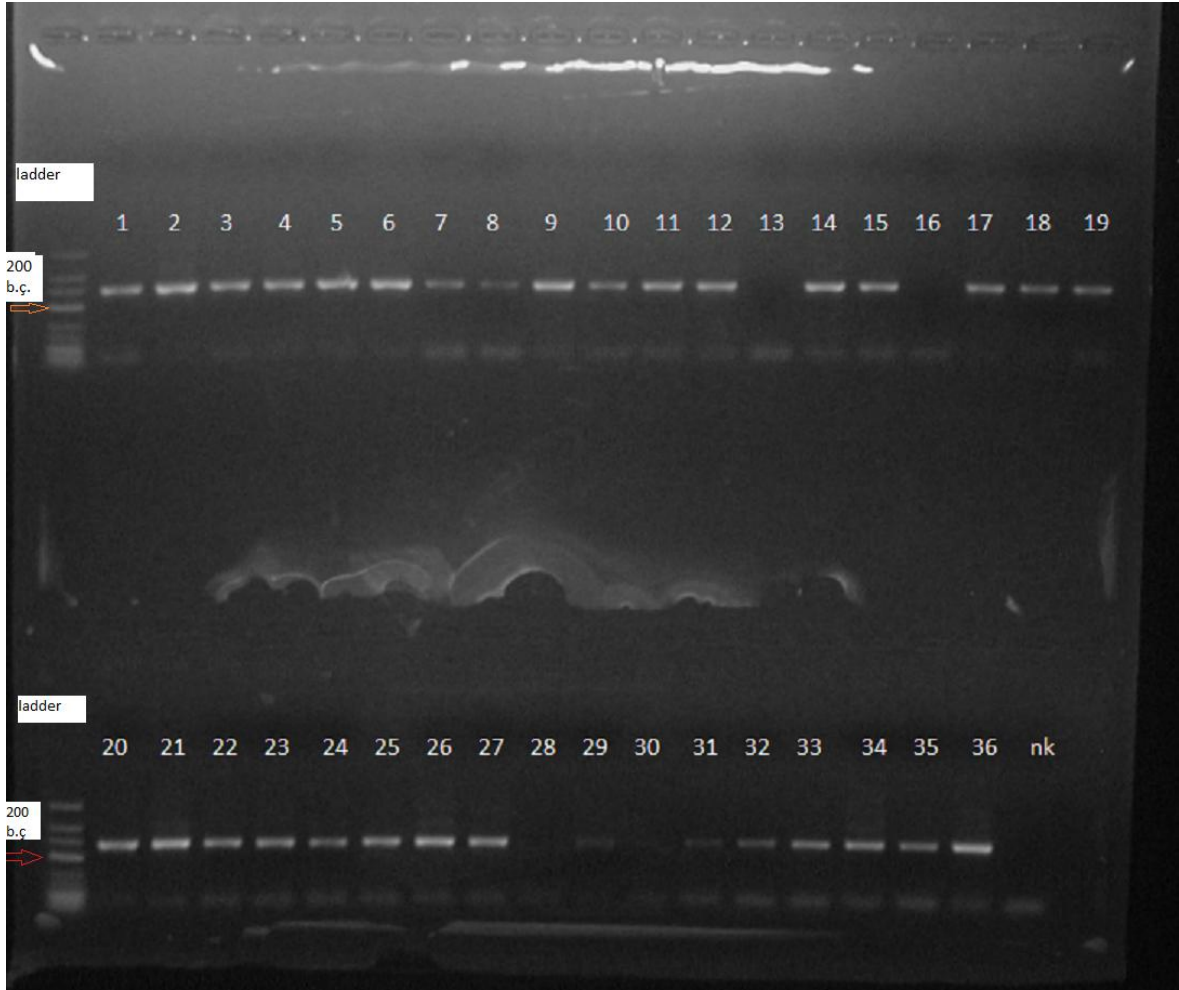
Şekil 5.3. HCV genotip 1b 1-30 arasındaki hastaların NS5A bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü

Çalışmaya alınan HCV genotip 1a'ya sahip olan hastalardan elde edilen HCV'nin NS5A bölgesinin PZR ile çoğaltıldıktan sonra %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve jel görüntüsü Şekilde 5.4 verilmiştir. Jel görüntüsünde birinci kuyucuk düşük moleküler ağırlıklı DNA belirtecini gösterirken 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 numaralı kuyucuklar 854 b.ç. uzunluğunda HCV genotip 1a'nın NS5A bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda pozitif çıkan hastaları gösterirken 2, 4, 5, 8, numaralı kuyucuklardaki örneklerde çoğalma görülmemiştir. nk ise negatif kontrolü göstermektedir.



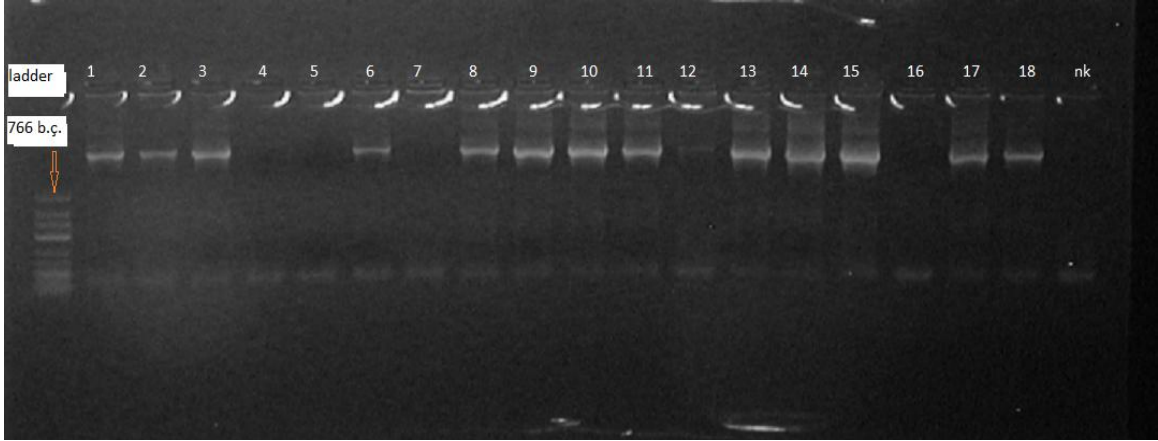
Şekil 5.4. HCV genotip 1a 1-18 arasındaki hastaların NS5A bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü

Çalışmaya alınan HCV genotip 2'ye sahip olan hastalardan elde edilen HCV'nin NS5B bölgesinin PZR ile çoğaltıldıktan sonra %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve jel görüntüsü Şekilde 5.5'de verilmiştir. Jel görüntüsünde birinci kuyucuk düşük moleküler ağırlıklı DNA belirtecini gösterirken 1-12, 14, 15, 17-27, 29, 31-36 numaralı kuyucuklardaki örnekler 381 b.ç. uzunluğunda HCV genotip 2'nin NS5B bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda pozitif çıkan hastaları gösterirken 13, 16, 28, 30 numaralı kuyucuklardaki örneklerde çoğalma görülmemiştir. nk ise negatif kontrolü göstermektedir.



Şekil 5.5. HCV genotip 2 1-36 arasındaki hastalarının NS5B bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü

Çalışmaya alınan HCV genotip 1b'ye sahip olan hastalardan elde edilen HCV'nin NS5B bölgesinin PZR ile çoğaltıldıktan sonra %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve jel görüntüsü Şekil 5.6'da verilmiştir. Jel görüntüsünde birinci kuyucuk düşük moleküler ağırlıklı DNA belirtecini gösterirken 1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18 numaralı kuyucuklardaki örnekler 1712 b.ç. uzunluğunda HCV genotip 1b'nin NS5B bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonucunda pozitif çıkan hastaları gösterirken 4, 5, 7, 12, 16 numaralı kuyucuklardaki örneklerde çoğalma görülmemiştir. nk ise negatif kontrolü göstermektedir.



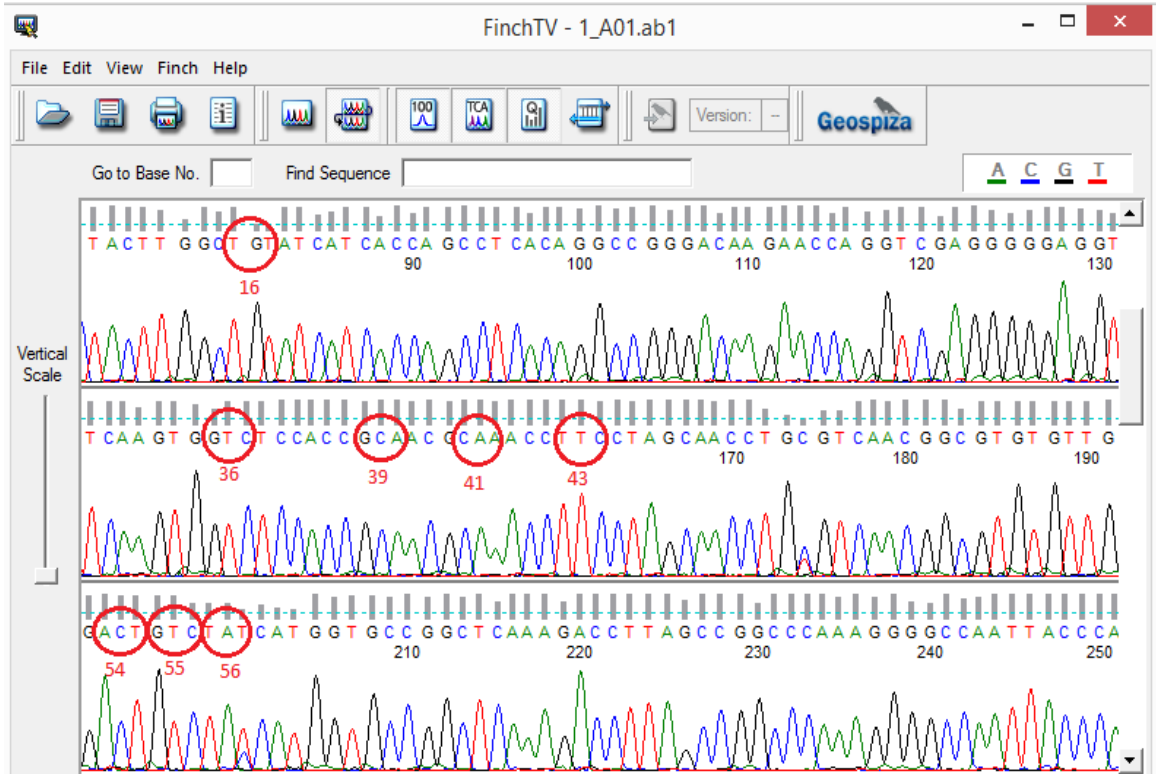
Şekil 5.6. HCV genotip 1b 1-18 arasındaki hastalarının NS5B bölgesi PZR ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü

5.2. DNA DİZİ ANALİZİ

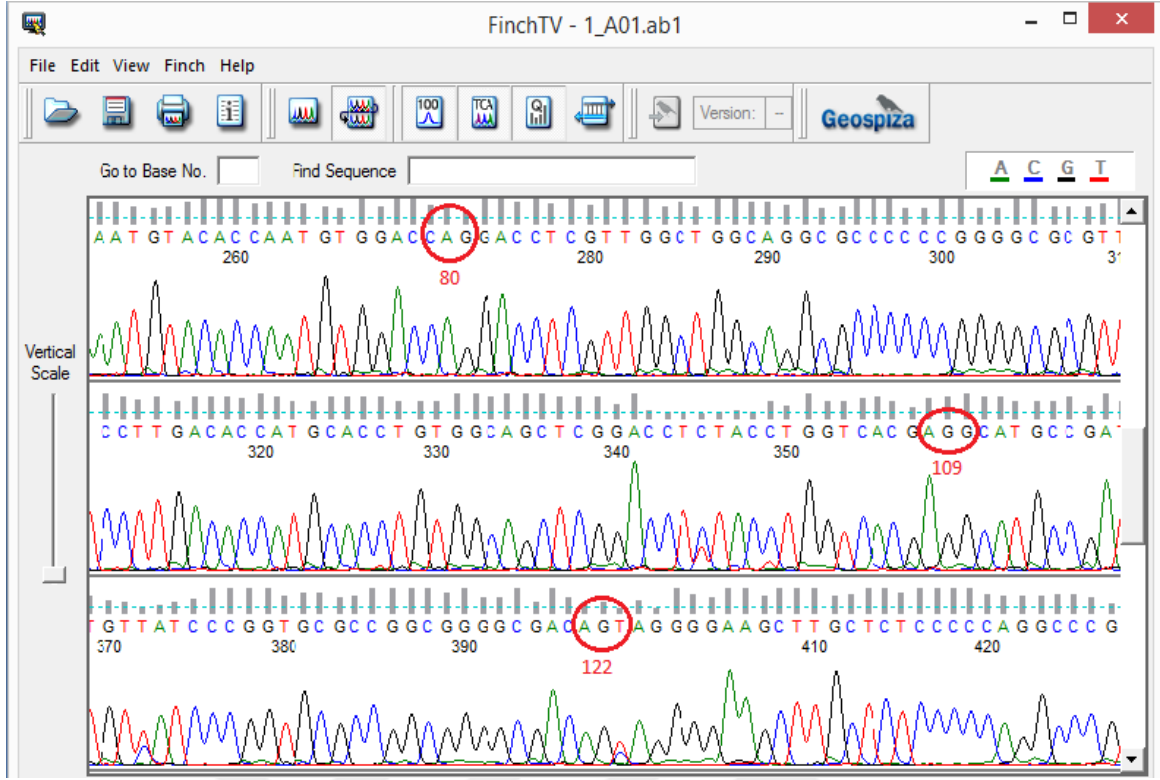
Jelde görüntüledikten sonra pozitif olan örneklerin PZR temizleme işlemi yapıldı ve spektrofotometre cihazında DNA yoğunluğu ölçülerek sekans PZR işlemi yapıldı. Sekans PZR temizleme işlemi de yapıldıktan sonra örnekler cihaza yüklendi. Sanger sekanslama tekniği ile ABI 310 cihazında yürütülen DNA dizilerinin analizi, Finch TV ve MEGA 6 programları kullanılarak yapıldı. HCV'nin NS3, NS5A ve NS5B bölgelerindeki dirençle ilgili olan noktalardaki nükleotit ve aminoasit değişiklikleri analiz edildi.

5.2.1. NS3 BÖLGESİ ANALİZ SONUÇLARI

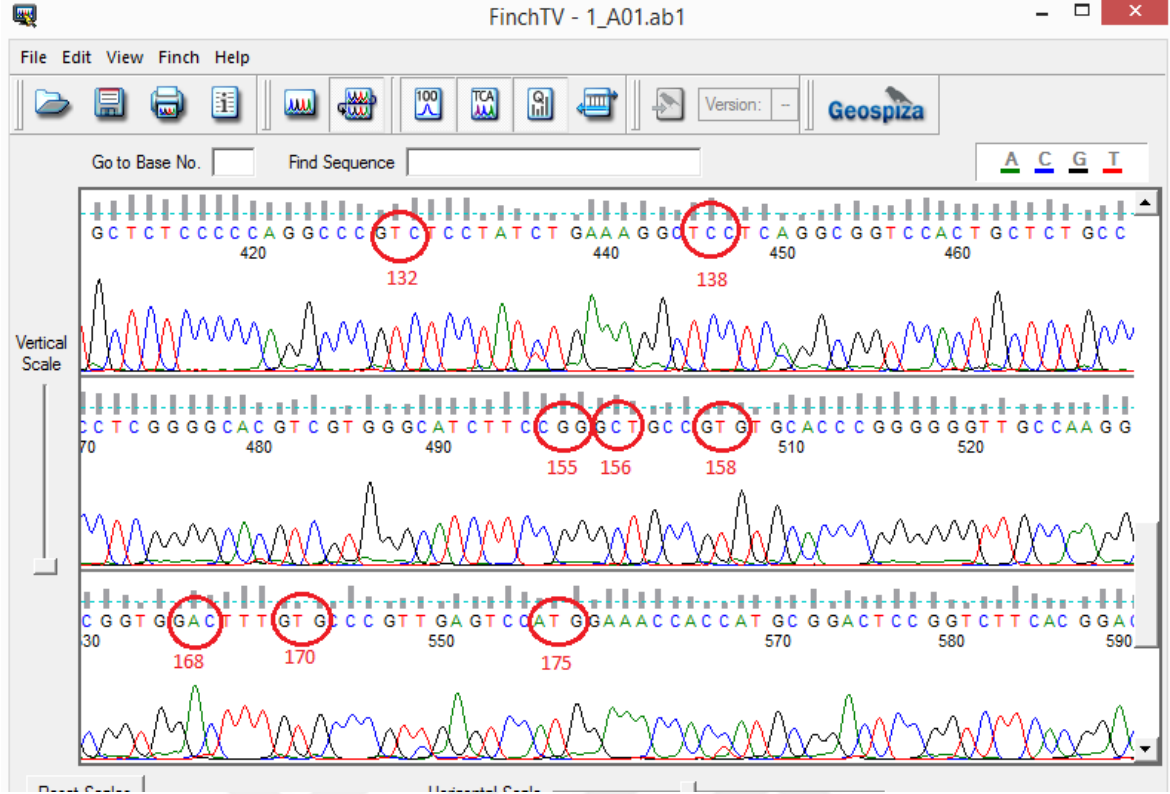
HCV NS3 bölgesindeki dirençle ilgili olan aminoasit noktalarının analizleri Finch TV (Şekil 5.7, 5.8, 5.9) ve Mega6 programı (Şekil 5.10) kullanılarak yapıldı.



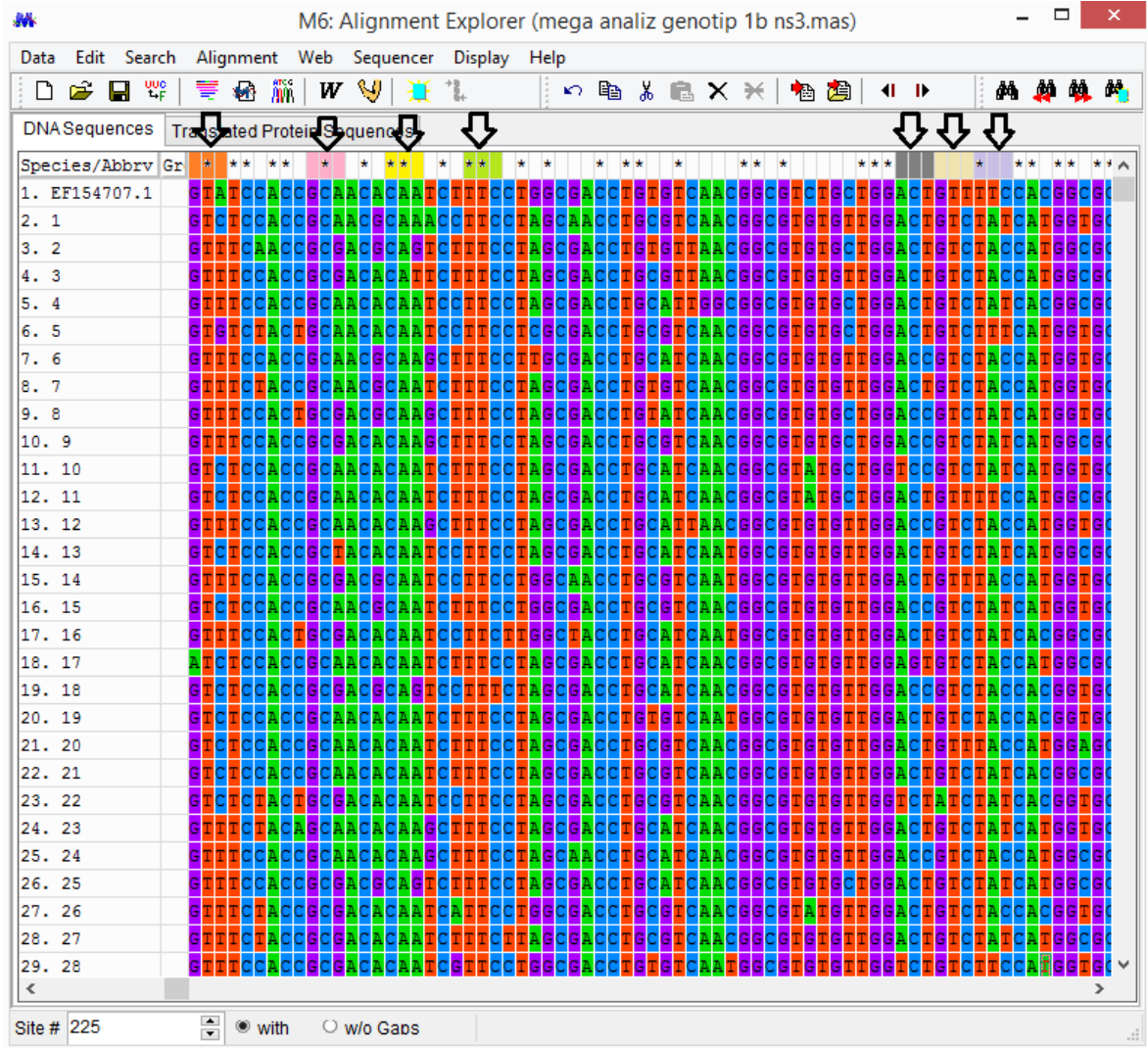
Şekil 5.7. HCV genotip 1b'ye ait NS3 bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS3 bölgesinin 16., 36., 39., 41., 43., 54., 55., 56. aminoasit noktalarını göstermektedir



Şekil 5.8. HCV genotip 1b'ye ait NS3 bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS3 bölgesinin 80., 109., 122. aminoasit noktalarını göstermektedir



Şekil 5.9. HCV genotip 1b'ye ait NS3 bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS3 bölgesinin 132., 138., 155., 156., 158., 168., 170., 175. aminoasit noktalarını göstermektedir



Şekil 5.10. HCV genotip 1b NS3 bölgesine ait örneklerin Mega6 programı kullanılarak karşılaştırılması. Siyah oklar sırasıyla NS3 bölgesi 36., 39., 41., 43 , 54., 55., 56. aminoasit noktalarını göstermektedir

Finch Tv ve Mega programları kullanılarak HCV NS3 proteaz bölgesindeki dirençle ilgili olan aminoasit noktaları analiz edilmiştir. Çizelge 5.3’de analiz edilen genotipler ve her bir genotipdeki örnek sayısı, dirençle ilgili olan aminoasit noktalarında görülen aminoasidin ne olduğu ve bu aminoasitlerin her bir genotipdeki görülme sayısı ve yüzdesi verilmiştir.

Çizelge 5.3 HCV 1b, 1a, 2, 3, 4 genotiplerinde, NS3-proteaz bölgesindeki dirençle ilgili pozisyonlardaki aminoasitlerin görülme sıklığı (referans dizilerin pubmed den erişim numaraları; genotip 1b için EF154707.1, genotip 1a için 510121872, genotip 2 için EF154709.1, genotip 3 için EF154712.1, genotip 4 için NC_009825.1)

Pozisyon	1b n=143	1a n=30	2 n=28	3 n=18	4 n=43
C16	143/143 %100	30/30 %100	1/28 %4		
C16A			21/28 %75		
C16T			6/28 %21		
T16				18/18 %100	41/43 %95
T16A					1/43 %2
T16C					1/43 %2
V36	139/143 %97	29/30 %97	1/28 %4		
V36I	2/143 %1				
V36L	2/143 %1	1/30 %3	26/28 %93		
V36M			1/28 %4		
L36				17/18 %94	42/43 %98
L36H				1/18 %6	
L36V					1/43 %2
A39	141/143 %99	29/30 %97	2/28 %7	18/18 %100	40/43 %93
A39T	1/143 %0,7				1/43 %2
A39S	1/143 %0,7				
A39A/T		1/30 %3			
A39V			26/28 %93		2/43 %5

Çizelge 5.3 (devam)

Q41	141/143 %99	30/30 %100	28/28 %100	18/18 %100	43/43 %100
Q41H	2/143 %1				
F43	143/143 %100	30/30 %100	28/28 %100	18/18 %100	43/43 %100
T54	133/143 %93	30/30 %100	28/28 %100	18/18 %100	43/43 %100
T54S	10/143 %7				
V55	139/143 %97	29/30 %97	28/28 %100	18/18 %100	43/43 %100
V55I	2/143 %1,4				
V55I/V	1/143 %0,7				
V55A	1/143 %0,7	1/30 %3			
Y56	134/143 %94	30/30 %100		18/18 %100	43/43 %100
Y56F	9/143 %6				
F56			2/28 %7		
F56Y			26/28 %93		
Q80	125/143 %87	21/30 %70	2/28 %7	18/18 %100	42/43 %98
Q80L	12/143 %8	1/30 %3			
Q80K	6/143 %4	7/30 %23			
Q80R		1/30 %3			
Q80G			26/28 %93		1/43 %2
R109	131/143 %92	30/30 %100	28/28 %100	18/18 %100	43/43 %100
R109K	12/143 %8				

Çizelge 5.3 (devam)

S122	119/143	%83	26/30	%87	1/28	%3		
S122G	11/143	%8	4/30	%13				
S122T	10 /143	%7			1/28	%3		
S122G/S	1/143	%0,7						
S122C	1/143	%0,7						
S122N	1/143	%0,7						
S122K					24/28	%86		
S122R					2/28	%7		
P122S							18/18	%100
T122							39/43	%91
T122A							1/43	%2
T122N							1/43	%2
T122S							1/43	%2
T122R							1/43	%2
I132	42/143	%29	30/30	%100			41/43	%95
I132V	98/143	%69					1 /43	%2
I132L	2/143	%1					1/43	%2
I132I/V	1/143	%0,7						
V132L					25/28	%89		
V132I					3/28	%11		
L132V							18/18	%100

Çizelge 5.3 (devam)

S138	143/143 %100	29/30 %97	28/28 %100	18/18 %100	43/43 %100
S138L		1/30 %3			
R155	142/142 %100	28/28 %100	28 %28 %100	17/18 %94	43/43 %100
R155K				1/18 %6	
A156	142/142 %100	29/29 %100	28/28 %100	18/18 %100	43/43 %100
V158	141/141 %100	4/27 %15	28 /28 %100	18/18 %100	42/43 %98
V158L		23/27 %85			1/43 %2
D168	138/139 %99	28/28 %100	27/28 %96		43/43 %100
D168N	1/139 %0,7				
D168E			1/28 %4		
Q168				17/18 %94	
Q168D				1/18 %6	
I170	45 /138 %33	27/28 %96		14/18 %78	
I170V	93/138 %67			4/18 %22	
I179H		1/28 %4			
V170			2/28 %7		40/43 %93
V170I			26/28 %93		1/43 %2
V170G					1/43 %2
V170C					1/43 %2

Şekil 5.3 (devam)

M175	132/135 %98		1/28 %4		
M175L	2/135 %1,5				
M175I	1/135 %0,7		26/28 %93		
M175S					
M175R			1/28 %4		
L175				17/18 %94	42/43 %98
L175R				1/18 %6	
L175M					1/43 %2



5.2.2. NS5A BÖLGESİ ANALİZ SONUÇLARI

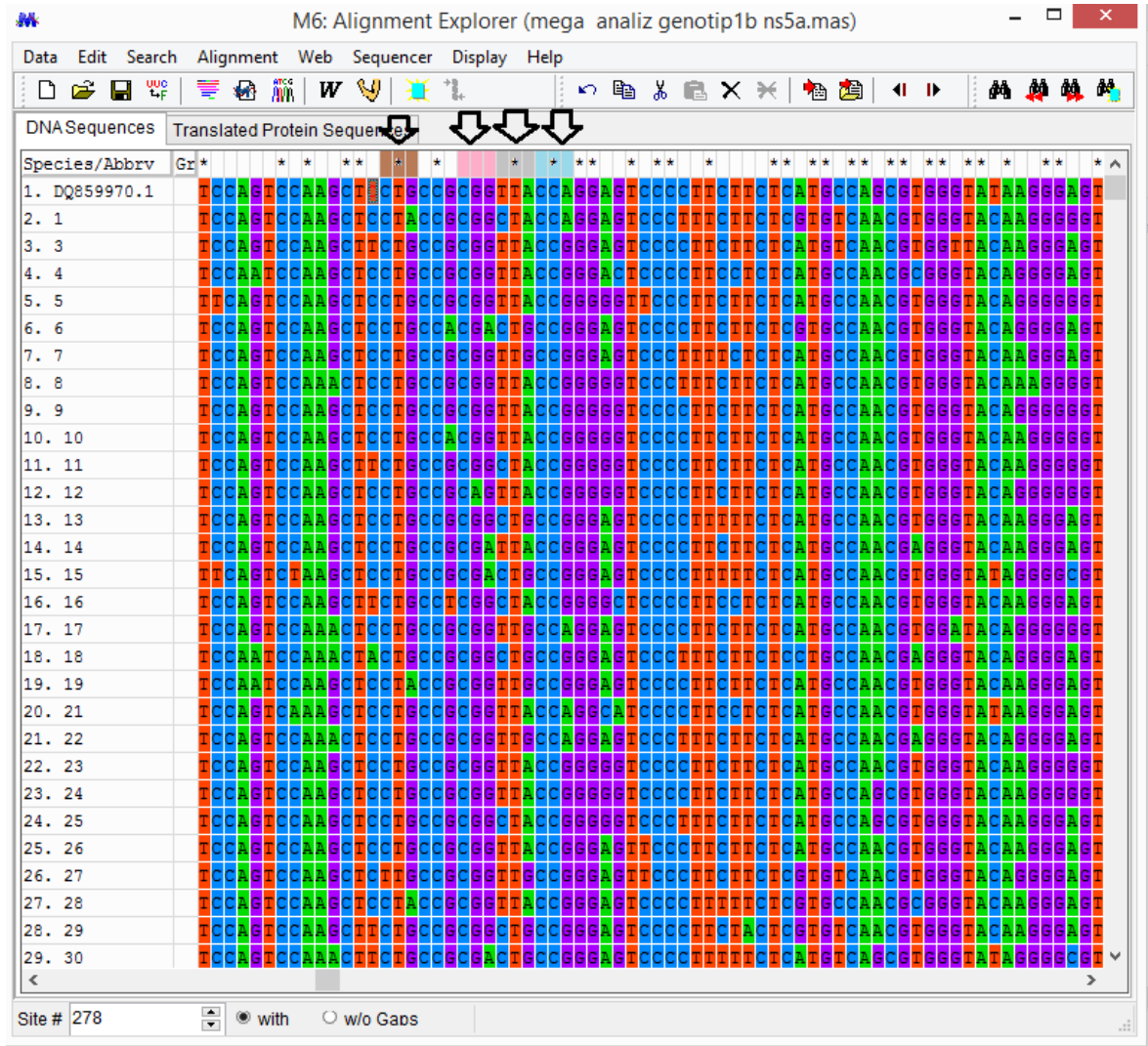
HCV NS5A bölgesindeki dirençle ilgili olan aminoasit noktalarının analizleri Finch TV (Şekil 5.11, 5.12) ve Mega6 programı (Şekil 5.13) kullanılarak yapıldı.



Şekil 5.11. HCV genotip 1b'ye ait NS5A bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5A bölgesinin 28., 30., 31., 32. aminoasit noktalarını göstermektedir



Şekil 5.12. HCV genotip 1b'ye ait NS5A bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5A bölgesinin 54., 58., 93. aminoasit noktalarını göstermektedir



Şekil 5.13. HCV genotip 1b NS5A bölgesine ait örneklerin Mega6 programı kullanılarak karşılaştırılması. Siyah oklar sırasıyla NS5A bölgesi 28., 30., 31., 32. aminoasit noktalarını göstermektedir

Finch Tv ve Mega programları kullanılarak HCV NS5A bölgesindeki dirençle ilgili olan aminoasit noktaları analiz edilmiştir. Çizelge 5.4’de analiz edilen genotipler ve her bir genotipdeki örnek sayısı, dirençle ilgili olan aminoasit noktalarında görülen aminoasidin ne olduğu ve bu aminoasitlerin her bir genotipdeki görülme sayısı ve yüzdesi verilmiştir.

Çizelge 5.4 HCV 1b ve 1a genotiplerinde NS5A bölgesindeki dirençle ilgili pozisyonlardaki aminoasitlerin görülme sıklığı (referans dizilerin pubmed den erişim numaraları; genotip 1b için DQ859970.1, genotip 1a için 510121872

Pozisyon	1b n=129	1a n=24
L28	125/129 %97	
L28M	4/129 %3	
M28		24/24 %100
R30	121/129 %94	
R30Q	7/129 %5	
R30S	1/129 %0,8	
Q30		24/24 %100
L31	124/129 %96	23/24 %96
L31M	4/129 %3	
L31M/L	1/129 %0,8	1/24 %4
P32	128/129 %99	24/24 %100
P32A	1/129 %0,8	
Q54	9/129 %7	
Q54H	80/129 %62	
Q54Y	26/129 %20	
Q54N	14/129 %11	
H54		24/24 %100

Şekil 5.4 (devam)

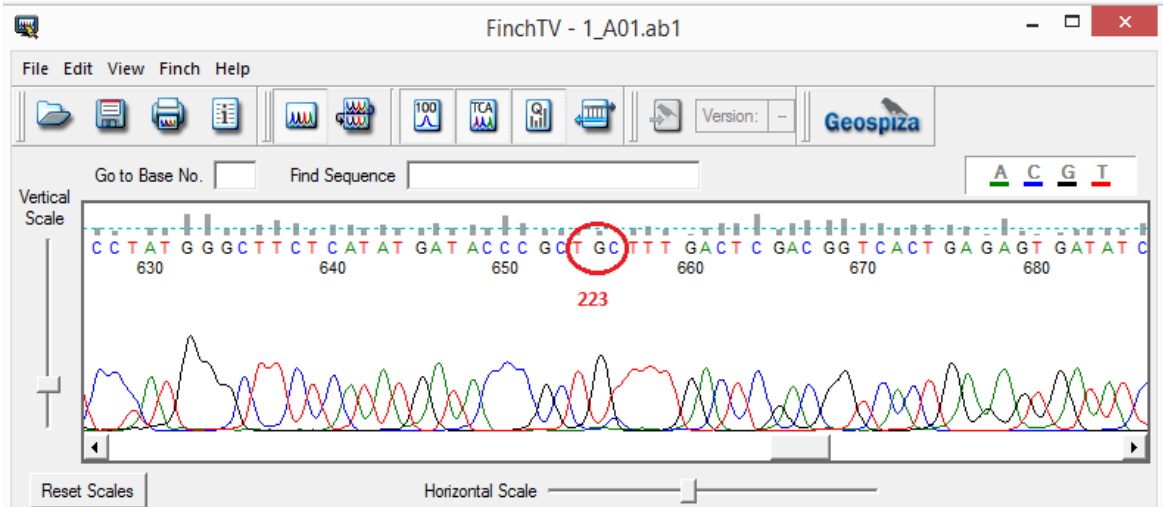
P58	114/129	%88		
P58S	7/129	%5		
P58T	4/129	%3		
P58L	2/129	%2		
P58N	1/129	%0,8		
P58H	1/129	%0,8		
H58			23/24	%96
H58Q			1/24	%24
Y93	126/129	%98	24/24	%100
Y93H	2/129	%1,6		
Y93H/Y	1/129	%0,8		

5.2.3. NS5B BÖLGESİ ANALİZ SONUÇLARI

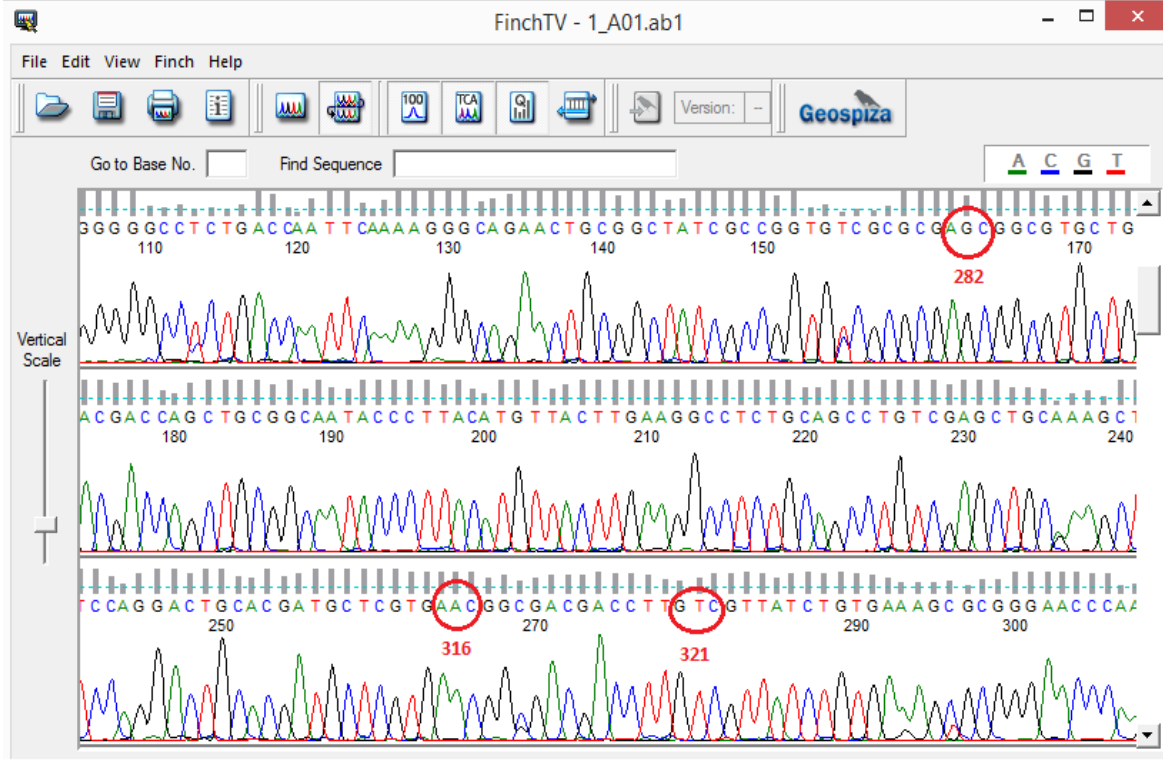
HCV NS5A bölgesindeki dirençle ilgili olan aminoasit noktalarının analizleri Finch TV(Şekil 5.14, 5.15, 5.16, 5.17, 5.18, 5.19) ve Mega6 programı (Şekil 5.20) kullanılarak yapıldı.



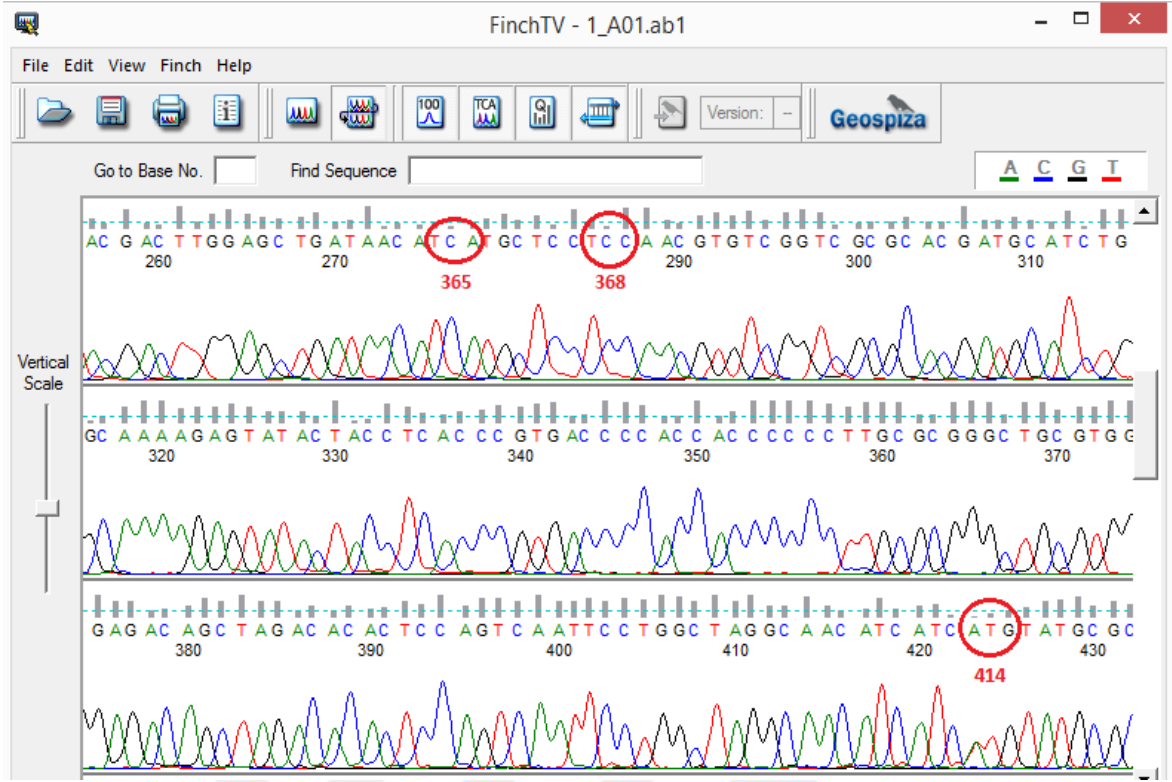
Şekil 5.14. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5B bölgesinin 95., 96., 142. aminoasit noktalarını göstermektedir



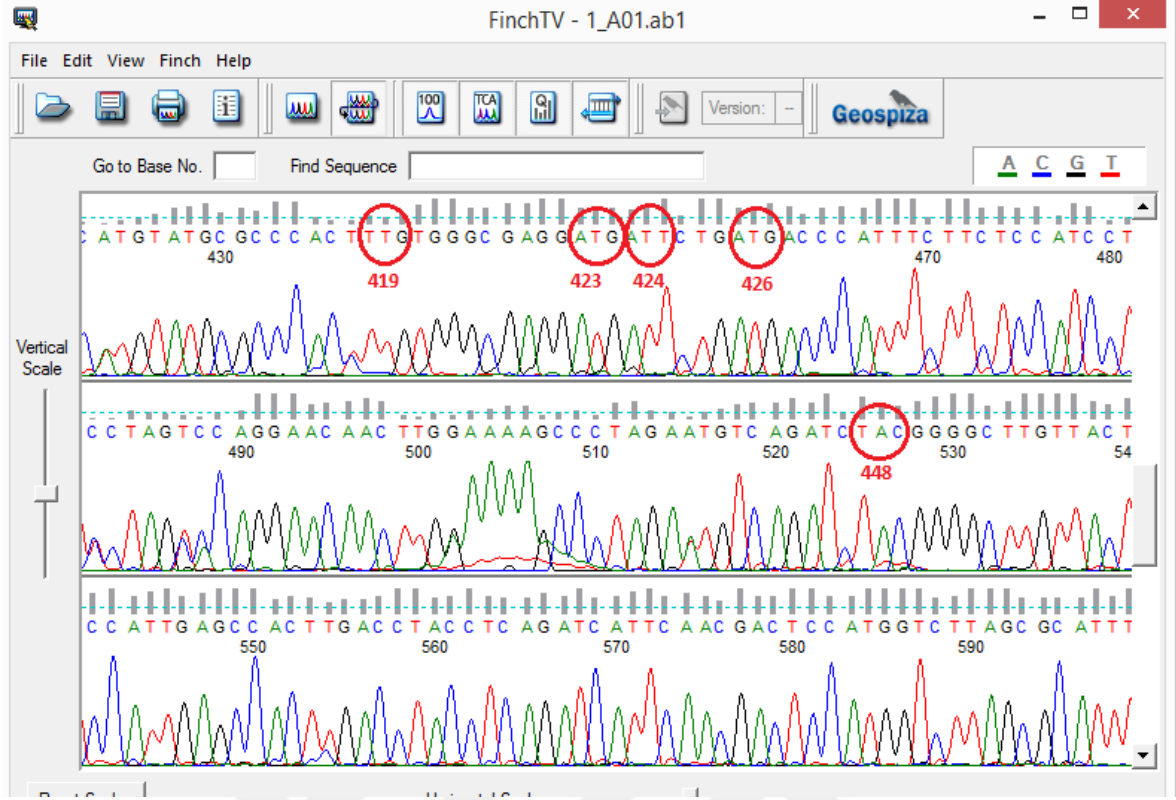
Şekil 5.15. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halka NS5B bölgesinin 223. aminoasit noktasını göstermektedir



Şekil 5.16. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5B bölgesinin 282., 316., 321. aminoasit noktalarını göstermektedir



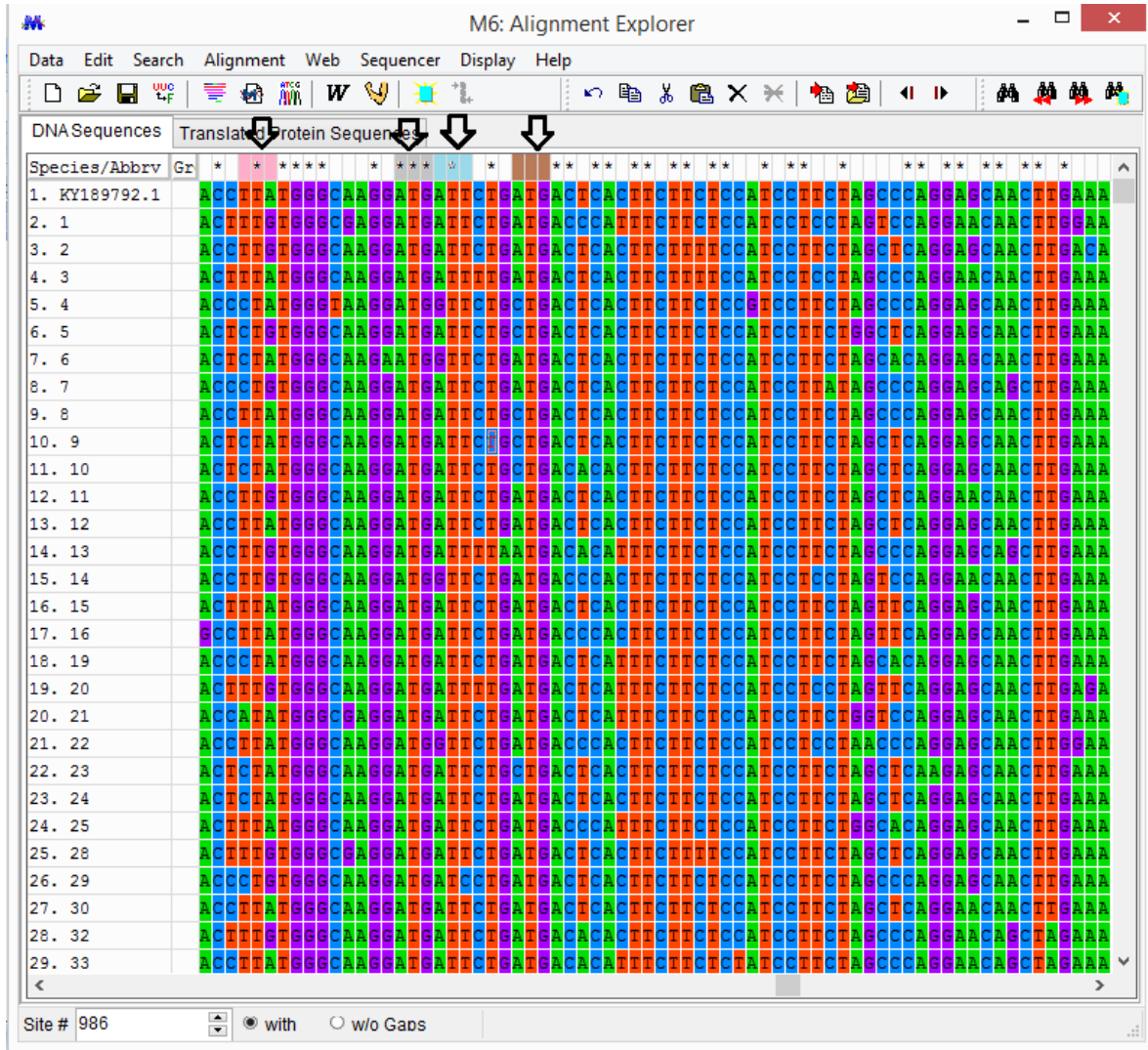
Şekil 5.17. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5B bölgesinin 365., 368., 414. aminoasit noktalarını göstermektedir



Şekil 5.18. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5B bölgesinin 419., 423., 424., 426., 448. aminoasit noktalarını göstermektedir.



Şekil 5.19. HCV genotip 1b'ye ait NS5B bölgesinin dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı halkalar sırasıyla NS5B bölgesinin 482., 494., 495., 496., 499. aminoasit noktalarını göstermektedir



Şekil 5.20. HCV genotip 1b NS5B bölgesine ait örneklerin Mega6 programı kullanılarak karşılaştırılması. Siyah oklar sırasıyla NS5B bölgesi 419., 423., 424., 426. aminoasit noktalarını göstermektedir

Finch Tv ve Mega programları kullanılarak HCV NS5B polimeraz bölgesindeki dirençle ilgili olan aminoasit noktaları analiz edilmiştir. Çizelge 5.5’de analiz edilen genotipler ve her bir genotipteki örnek sayısı, dirençle ilgili olan aminoasit noktaları incelendi ve bu noktalardaki görülen aminoasidin ne olduğu ve bu aminoasitlerin her bir genotipteki görülme sayısı ve yüzdesi verilmiştir.

Çizelge 5.5 HCV 1b, 1a, 2, 3, 4 genotiplerinde NS5B-polimeraz bölgesindeki dirençle ilgili pozisyonlardaki aminoasitlerin görülme sıklığı (referans dizilerin pubmed den erişim numaraları; genotip 1b için KY189792.1, genotip 1a için 510121872, genotip 2 için 157781212, genotip 3 için D17763.1, genotip 4 için NC_009825.1

Pozisyon	1b n=82	1a n=29	2 n=32	3 n=16	4 n=58
H95	82/82 %100				
S96	82/82 %100				
N142	81/82 %98,8				
N142S/N	1/82 %1,2				
L159	20/82 %24				
L159F	62/82 %76				
C223	82/82 %100				
S282	81/82 %98,8	29/29 %100	32/32 %100	16/16 %100	
S282G	1/82 %1,2				
T282S					58/58 %100
C316	14/81 %17	29/29 %100	32/32 %100	16/16 %100	58/58 %100
C316N	66/81 %81				
C316I	1/81 %1				
L320	82/82 %100	29/29 %100	32/32 %100	16/16 /100	58/58 %100
V321	81/81 %100	29/29 %100	31/32 %97	16/16 %100	58/58 %100
V321I/V			1/32 %3		
S365	82/82 %100				
S368	82/82 %100				

Çizelge 5.5 (devam)

M414	77/82	%94				
M414L	4/82	%5				
M414M/L	1/82	%1				
L419	77/82	%94				
L419I	4/82	%5				
L419G	1/82	%1				
M423	82/82	%100				
I424	74/82	%90				
I424V	8/82	%10				
M426	71/82	%87				
M426L	9/82	%11				
M426M/L	1/82	%1				
M426C	1/82	%1				
Y448	82/82	%100				
I482	82/82	%100				
V494	80/82	%98				
V494A	1/82	%1				
V494D	1/82	%1				
P495	82/82	%100				
P496	82/82	%100				
V499	64/82	%78				
V499A	14/82	%17				
V499T	3/82	%4				
V499A/V	1/82	%1				

Yapılan dizi analizi sonucunda dirençle ilgili olan aminoasit noktaları incelenmiştir. Bu noktalarda tespit edilen RASs, ve bu değişimlerin her bir genotipteki görülme sayısı ve yüzdesi, hangi ilaç direncine sebep olduğu Çizelge 5.6’da verilmiştir.

Çizelge 5.6 HCV 1a,1b, 2, 3, 4 genotiplerinin NS3, NS5B ve NS5A bölgelerinde görülen RASs

	RAS	Genotip 1b Hasta sayısı (%)	Genotip 1a	Genotip 2	Genotip 3	Genotip 4	İLAÇ
NS5A	L31M	4/129 (%3)	1/24 (M/L) (%4)				Daclatasvir Ledipasvir
	Y93H	2/129 (%1,6)					Daclatasvir Ledipasvir Ombitasvir

Çizelge 5.6 (devam)

NS5B	L159F	62/82 (%76)					Sofosbuvir
	C316N	66/81 (%81)					Dasabuvir Tegabuvir HCV796
	V321I/V			1/32 (%3)			PSI- 352938 PSI- 353661
	M414L	4/82 (%5)					Dasabuvir, Tegobuvir, HCV796
	I424V	8/82 (%10)					HCV796
	V494A	1/82 (%1)					Tegobuvir
	V499A	14/82 (%17)					JTK-109 Deleobuvir

Şekil 5.6 (devam)

NS3	V36M			1/28 (%4)			Boceprevir Asunaprevir Paritaprevir Telaprevir
	A39V			26/28 (%93)		2/43 (%5)	ACH-806
	T54S	10/143 (%7)					Boceprevir Telaprevir
	V55A	1/143 (%0,7)	1/30 (%3)				Boceprevir Telaprevir
	Q80K	6/143 (%4)	7/30 (%23)				Asunaprevir, Paritaprevir, Simeprevir
	Q80R		1/30 (%3)				Asunaprevir, Paritaprevir, Simeprevir
	R109K	12/143 (%8)					Boceprevir Telaprevir
	S122R			2/28 (%7)			Asunaprevir, Simeprevir

Şekil 5.6 (devam)

NS3	1132V	98/143 (%69)				1/43 (%2)	Telaprevir
	R155K				1/18 (%6)		Asunaprevir, Boceprevir, Paritaprevir, Simeprevir, Telaprevir
	D168E				1/28 (%4)		Asunaprevir, Paritaprevir, Simeprevir
	M175L	2/135 (%1,5)					Boceprevir

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kronik HCV enfeksiyonu, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinomaya sebep olan ana unsurdur (39,40). Dünyada yaklaşık olarak 71 milyon insanın kronik HCV enfeksiyonuna sahip olduğu bilinmektedir (1). Kronik HCV enfeksiyon tedavisinde asıl amaç virüsün tamamen ortadan kalkmasını sağlayarak bu hastalıkların oluşmasını engellemektir.

Son yıllarda kronik HCV enfeksiyon tedavisinde direkt etki eden antivirallerin kullanılmasıyla tedavi başarı oranı %90'ların üzerine çıkmıştır. Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu tedavisinde kullanılan DAA'lar, HCV nin yapısal olmayan proteinlerinden NS3/NS4A, NS5A, NS5B bölgelerini hedeflemektedir. HCV'nin doğrulama mekanizması olmadan yüksek replikasyon kapasitesine sahip olması çok sayıda aminoasit değişikliğine neden olan viral genetik bir heterojenite oluşturmaktadır. Bu farklı varyantların anti-viral tedavi sürecinde seçimleri ilaç direncini belirleyebilmektedir.

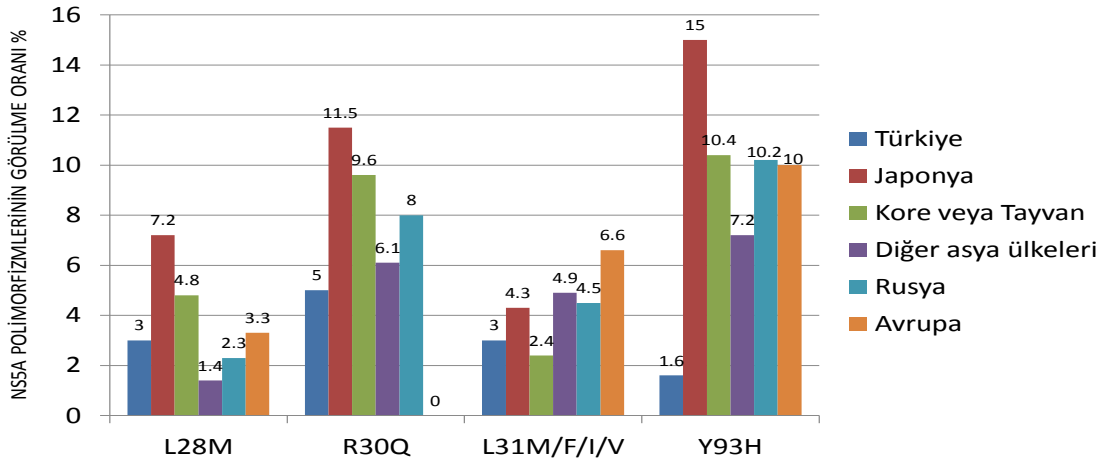
Yaptığımız literatür taraması sonucunda kronik HCV tedavisinde dirençle ilgili olarak belirlemiş 48 adet dirençle ilgili olan aminoasit değişimi tespit edildi. (Çizelge 2.1). Çalışmaya dahil edilen hastalardan izole edilen HCV RNA'nın, literatür taraması ile belirlenen antiviral dirence sebep olan aminoasit noktalarını içerisine alan bölgelerinin dizi analizi yapıldı ve bu noktalardaki aminoasit noktaları incelendi. DNA dizi analizi sonucunda HCV'nin NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinde toplamda 285 hastada bakılan 48 adet dirençle ilgili aminoasit değişikliğinden 21 tanesi görülmüştür (Çizelge 5.6).

Yapılan çok sayıda PZR denemeleri sonucunda HCV'nin yüksek oranda genetik heterojeniteye sahip olması, yani HCV varyantları arasında DNA dizilimi bakımından farklılıkların olması ve korunmuş bölgelerin kısıtlı olması PZR ile istenilen bölgelerin çoğaltılmasına engel olmuş ve Çizelge 5.1'de belirtilen bazı genotiplere ait bazı bölgeler çoğaltılamamıştır. İleriki çalışmalar için, viral genomdaki korunmuş bölgeler göz önüne alınarak yeni primerler tasarlanması ve daha fazla PZR denemelerinin yapılması çoğaltılamayan bölgelerin çoğaltılmasını sağlayabilecektir.

NS5A bölgesi: HCV genotip 1b ye sahip 129 hasta ve HCV genotip 1a ya sahip 24 hastanın NS5A bölgesindeki RASs analizi yapılmış, HCV genotip 2, 3, 4'e ait NS5A bölgesinin analizi PZR ile çoğaltılamadığı için yapılamamıştır.

Yapılan analiz sonucunda HCV genotip 1b ye sahip hastaların %3'ünde (4/129) ve HCV genotip 1a ya sahip hastaların %4'ünde (1/24) daclatasvir, ledipasvir direncine sebep L31M aminoasit değişikliği görülmüştür. HCV genotip 1b ye sahip hastaların %1,6'sında Y93H daclatasvir, ledipasvir, ombitasvir direncine sebep olan aminoasit değişikliği görülürken bu aminoasit değişimi HCV genotip 1a ya sahip hastaların hiçbirinde görülmemiştir.

Türkiyede HCV NS5A bölgesindeki dirençle ilgili olan aminoasit değişiminin belirlenmesinde yönelik bir çalışma yapılmamışken, farklı ülkelerde, tedavi görmemiş HCV 1b ile enfekte hastalarda yapılan çalışmalar ve bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerle ilgili oranlar Şekil 6.1' de verilmiştir.



Şekil 6.1 Tedavi görmemiş HCV 1b ile enfekte hastalarda NS5A polimorfizimlerin görülme oranı

NS5B bölgesi: HCV 1b ile enfekte hastalarda, NS5B bölgesinde dirençle ilgili olarak belirlenmiş aminoasit noktalarının hepsini içine alan bölge PZR ile çoğaltılıp dizi analizi yapılırken, HCV genotip 1a, 2, 3 ve 4 e sahip hastaların sadece 282., 316., 320, 321. aminoasit noktalarının içeren kısmın PZR ile çoğaltılarak analizi yapılabilmektedir.

HCV genotip 1b ye sahip hastaların %81'inde (66/81) görülen dasabuvir, tegabuvir direncinde sebep olan C316N aminoasit değişikliği NS5B bölgesinde en baskın olarak görülen RAS dir. HCV genotip 1b ye sahip hastaların %76'sında (62/82) sofosbuvir direncine sebep olan L159F, %5'inde (4/82) dasabuvir, tegobuvir direncine sebep olan M414L aminoasit değişikliği, %10'unda (8/82) boceprevir direncine sebep olan I424V aminoasit değişikliği, %1'inde (1/82) tegobuvir direncine sebep olan V499A aminoasit değişikliği, %17'sinde (14/82) delobuvir direncine sebep olan aminoasit değişikliği görülmüştür.

Çalışmamızda NS5B bölgesinde HCV genotip 1b ile enfekte hastalarda C316N (%81), en baskın olarak görülen RAS olarak karşımıza çıkmıştır. Çalışmamızdaki bu sonuç yine HCV genotip 1b ile enfekte hastalarda Çin'de (%100) yapılan çalışma ile uyumludur fakat bu oran Avrupa (%32) ve Amerika'da (%36) yapılan çalışma daha düşüktür (52,53).

Çalışmamızda NS5B bölgesinde, V499A (%17), baskın olarak görülen bir diğer RAS olarak görülmüştür. Ayrıca C316N+V499A %13 oranında ve L159F+C316N aminoasit değişimi ise % 68 oranında çalışmaya alınan HCV genotip 1b ile enfekte hastalarda beraber görülmüştür. Bu aminoasit değişimleri klonal analiz yöntemiyle çalışılıp, aynı genom üzerinde olup olmadığı araştırılmalıdır. Bu da daha sonraki hücre kültürü çalışmalarıyla beraber, birlikte bir dirence sebep olup olmadıklarının araştırılması açısından önemli olabilecektir.

Çalışmamızda NS5B inhibitörü olan Sofosbuvir'e karşı yüksek oranda dirence sebep olan S282T aminoasit değişimi çalışmamıza alınan genotiplerin hiçbirinde görülmemiştir. Yine benzer şekilde Li ve ark.'nın Çin'de HCV 1b ile enfekte hastalarda (53), Paolucci ve ark.'nın İtalya'da HCV genotip 1b ve 1a ile enfekte hastalarda (66), Alves ve ark.'nın Amerika'da 1a, 1b ve 3a ile enfekte hastalarda da yaptığı çalışmalarda (52) S282T mutasyonu görülmemiştir.

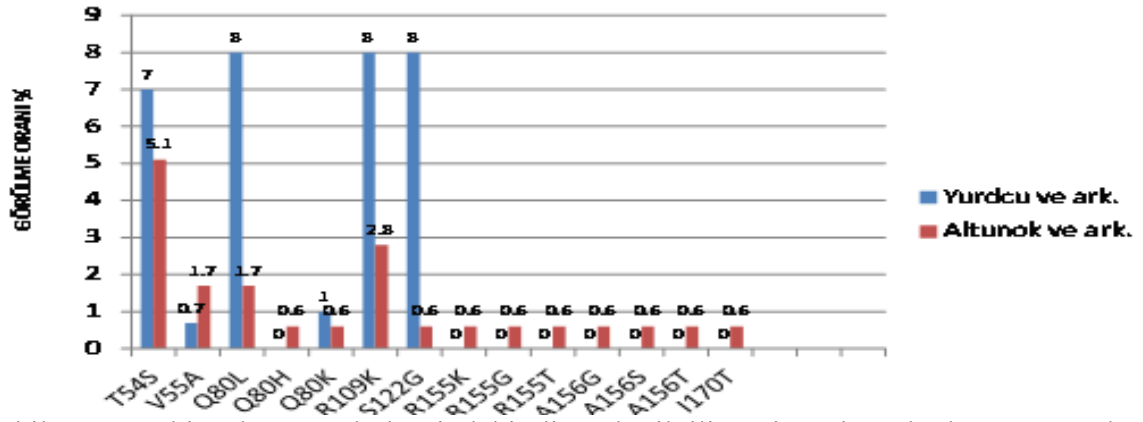
Yaptığımız çalışma sonucunda Türkiye'de en baskın HCV genotipi olan 1b'de diğer genotiplere kıyasla NS5B bölgesinde yüksek oranda ilaç direncine sebep olan varyantların bulunduğunu, Türkiye'de görülme sıklığı açısından ikinci sıradaki HCV genotip 1a'nın ise NS5B polimeraz inhibitörlerine karşı hiçbir direnç varyantı içermediğini söyleyebiliriz.

Türkiye’de NS5B bölgesindeki antiviral direnç varyantlarının belirlenmesiyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

NS3 bölgesi: Çalışmamızda farklı genotiplerin NS3 bölgesindeki analiz sonucunda antiviral dirence sebep olan toplam 12 adet farklı aminoasit değişimi görülmüştür. Bunlar içinde HCV genotip 2 ile enfekte hastalarda A39V (%93) ve HCV genotip 1b ile enfekte hastalarda I132V (%69) en baskın olarak RASs dır.

Oldukça yüksek oranda Simeprevir direncine sebep olan Q80K aminoasit değişimi çalışmamızda HCV genotip 1b ile enfekte hastalarda %4 oranında görülürken, HCV genotip 1a ile enfekte hastalarda görülme sıklığı %23 dür. Q80K aminoasit değişimi, Alves ve ark.’nın Brezilya’daki hastalarda HCV genotip 1a ile enfekte hastalarda bu oran %36 iken 1b ile enfekte hastalarda %0,2 oranında görülmüştür (52). Li ve ark. Çin’de HCV 1b ile enfekte 60 hastada yaptığı çalışmada Q80K değişimi görülmemiştir (53). Vicenti ve ark. Q80K direncini, İtalya’da 1b ile enfekte hastalarda %10,1 oranında görürken, 1a ile enfekte hastalarda %29,4 oranında görmüştür (73).

Türkiye’deki Altunok ve arkadaşları 178 adet antiviral tedavi almamış HCV genotip 1b ile enfekte hastaların NS3 bölgesindeki dirençle ilgi olan aminoasit noktalarının araştırılması ile ilgi çalışma yapmıştır (74). Yapılan analiz sonucunda dirençle ilgili aminoasit noktalarındaki aminoasitlerin görülme oranları, bizim çalışmamızdaki oranlarla beraber Şekil 6.2’ de verilmiştir.



Şekil 6.2 Türkiye'de NS3 bölgesindeki dirençle ilgili aminoasit noktalarının görülme oranları

Türkiye'de Altunok ve ark. tarafından HCV 1b ile enfekte, Şanlıdağ ve ark. tarafından ise genotip 1 ile enfekte, daha önce antiviral tedavi almamış HCV hastalarını NS3 bölgesindeki dirençle ilgili olarak belirlenmiş aminoasit değişikliklerinin araştırılmasına dair çalışmalar yapılmıştır (74,75). Bizim çalışmamızda ise HCV'nin NS3, NS5A ve NS5B bölgelerindeki dirençle ilgili olarak belirlenmiş aminoasit değişikliklerinin Türkiye'deki farklı HCV genotiplerinde araştırılmıştır ve bu kapsamda Türkiye'de şimdiye kadar yapılan tek çalışmadır.

Yapılan çalışmalar arasında oransal farkların olması HCV'nin dinamik bir genom yapısına sahip olması neden olmuş olabilir. Bu da virüs aynı genotip olsa bile genom dizisi bakımından bölgesel olarak birbirinden oldukça farklı olabileceğini düşündürmektedir.

Direnç varyantlarının tespiti için farklı yöntemler bulunmaktadır. Doğrudan DNA dizi analizi yöntemi, dirençle ilgili varyantların ve virüs popülasyonlarının belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemdir. Ancak DNA dizi analizinin düşük bir tespit sınırı vardır; viral havuzda bulunan bir varyantın tespit edilebilmesi için havuzda en az %15-25 oranında bulunması gerekmektedir (76). Bu orandan daha az bulunan varyantın tespiti yapılamaz. Klonal analiz yöntemi ile viral popülasyonda DNA dizi analizi yöntemi ile belirlenemeyecek kadar az olan varyantların tespiti mümkündür. Klonal analizin duyarlılık oranı yüksektir fakat pahalı ve uzun zaman harcanması gerektiği gibi sınırlamaları vardır.

Direnç varyantlarının belirlenmesinde diğerk bir yöntem ise ‘ultra deep sequencing’ yöntemidir. Bu yöntem ile viral gen havuzunda %0,5 kadar düşük oranda bulunan viral varyantların tespiti mümkündür (51).

İleriki çalışmalarda direnç varyantlarının belirlenmesi için ‘*ultra deep sequencing*’ yönteminin kullanılması düşünülebilir. Bu yöntem, daha fazla sayıda varyantın tespitine olanak sağlayacaktır.

Dirençle ilgili olan aminoasit değışimlerinin HCV enfeksiyonlu hastalarda belirlenmesi tedavi başarısızlığı durumunda, kullanılan antivirallerin değıştirilmesinde oldukça önemli olacaktır. Ayrıca HCV enfeksiyonuna sahip hastalarda tedaviye başlamadan önce RAS sn belirlenmesi düşünülebilir. Çünkü hastanın bu dirence sebep olan varyantı içermesi antiviral tedavide başarısızlığa sebep olacaktır. Hastanın dirence sebep olabilecek aminosit değışimlerini içeren varyanta sahip olup olmamasına göre uygulanacak antiviral tedavi protokolü belirlenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Organization WH. Hepatitis C. Accessed September, 2017.
2. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/24336/title/Culturing-Hepatitis-C/>. Culturing Hepatitis C. 2006. Accessed June, 2017.
3. Tan S-L. *Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology*. Horizon Scientific Press; 2006.
4. Alvisi G, Madan V, Bartenschlager R. Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection. *RNA biology*. 2011;8(2):258-269.
5. Kim CW, Chang K-M. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clinical and molecular hepatology*. 2013;19(1):17.
6. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset F-L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1–E2 envelope protein complexes. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;197(5):633-642.
7. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Bevitt DJ, Toms GL. Characterization of the genome and structural proteins of hepatitis C virus resolved from infected human liver. *Journal of General Virology*. 2004;85(6):1497-1507.
8. Zeisel MB, Barth H, Schuster C, Baumert TF. Hepatitis C virus entry: molecular mechanisms and targets for antiviral therapy. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2009;14:3274.
9. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998;282(5390):938-941.
10. Agnello V, Ábel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang Q-X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(22):12766-12771.
11. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO journal*. 2002;21(19):5017-5025.
12. Lozach P-Y, Amara A, Bartosch B, et al. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(31):32035-32045.
13. Barth H, Schäfer C, Adah MI, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(42):41003-41012.
14. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. 2007;446(7137):801.

15. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *Journal of virology*. 2009;83(4):2011-2014.
16. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*. 2009;457(7231):882.
17. Heinz FX, Allison SL. Flavivirus structure and membrane fusion. *Advances in virus research*. 2003;59:63-97.
18. Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *Journal of virology*. 2006;80(4):1734-1741.
19. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology*. 2006;80(14):6964-6972.
20. Egger D, Wölk B, Gosert R, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of virology*. 2002;76(12):5974-5984.
21. Gosert R, Egger D, Lohmann V, et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *Journal of virology*. 2003;77(9):5487-5492.
22. Targett-Adams P, Boulant S, Douglas MW, McLauchlan J. Lipid metabolism and HCV infection. *Viruses*. 2010;2(5):1195-1217.
23. Pereira AA, Jacobson IM. New and experimental therapies for HCV. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2009;6(7):403-411.
24. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*. 1994;19(5):1321-1324.
25. Anderson JC, Simonetti J, Fisher DG, et al. Comparison of different HCV viral load and genotyping assays. *Journal of Clinical Virology*. 2003;28(1):27-37.
26. Simmonds P, Mellor J, Sakuldamrongpanich T, et al. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. *Journal of General Virology*. 1996;77(12):3013-3024.
27. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology*. 1994;19(1):13-18.
28. McOmish F, Yap P, Dow B, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994;32(4):884-892.

29. Nousbaum J-B, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Brechot C. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Annals of internal medicine*. 1995;122(3):161-168.
30. Zein NN, Rakela J, Krawitt EL, Reddy KR, Tominaga T, Persing DH. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. *Annals of internal medicine*. 1996;125(8):634-639.
31. Takada N, Takase S, Takada A, Date T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *Journal of hepatology*. 1993;17(3):277-283.
32. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(2):223-235.
33. Pawlotsky J-M, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;171(6):1607-1610.
34. Chamberlain RW, Adams N, Saeed AA, Simmonds P, Elliott RM. Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East. *Journal of General Virology*. 1997;78(6):1341-1347.
35. Agha S, Tanaka Y, Saady N, et al. Reliability of hepatitis C virus core antigen assay for detection of viremia in HCV genotypes 1, 2, 3, and 4 infected blood donors: a collaborative study between Japan, Egypt, and Uzbekistan. *Journal of medical virology*. 2004;73(2):216-222.
36. Cha T, Beall E, Irvine B, et al. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(15):7144-7148.
37. Murphy DG, Willems B, Deschênes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(4):1102-1112.
38. Liver EAftSot. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *Journal of hepatology*. 2017;66(1):153.
39. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*. 2012;379:1245-1255.
40. Takeda H, Takai A, Inuzuka T, Marusawa H. Genetic basis of hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma: linkage between infection, inflammation, and tumorigenesis. *Journal of gastroenterology*. 2017;52(1):26-38.
41. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine*. 1998;339(21):1485-1492.

42. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *The Lancet*. 2001;358(9286):958-965.
43. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(13):975-982.
44. Liver EAFTSOT. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology*. 2011;55(2):245-264.
45. Antaki N, Craxi A, Kamal S, et al. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver International*. 2010;30(3):342-355.
46. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*. 2004;39(4):1147-1171.
47. Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, et al. Peginterferon- α 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis ca randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Annals of internal medicine*. 2004;140(5):346-355.
48. Lontok E, Harrington P, Howe A, et al. Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology*. 2015;62(5):1623-1632.
49. Martell M, Esteban JI, Quer J, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *Journal of virology*. 1992;66(5):3225-3229.
50. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*. 2000;81(7):1631-1648.
51. Gregori J, Esteban JI, Cubero M, et al. Ultra-deep pyrosequencing (UDPS) data treatment to study amplicon HCV minor variants. *PLoS One*. 2013;8(12):e83361.
52. Alves R, Queiroz ATld, Pessoa MG, et al. The presence of resistance mutations to protease and polymerase inhibitors in Hepatitis C virus sequences from the Los Alamos databank. *Journal of viral hepatitis*. 2013;20(6):414-421.
53. Li Z, Zhang Y, Liu Y, et al. Naturally occurring drug resistance associated variants to hepatitis C virus direct-acting antiviral agents in treatment-naive HCV genotype 1b-infected patients in China. *Medicine*. 2017;96(19).
54. Kuntzen T, Timm J, Berical A, et al. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naive patients. *Hepatology*. 2008;48(6):1769-1778.
55. Pawlotsky J-M. Hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral drugs in interferon-free regimens. *Gastroenterology*. 2016;151(1):70-86.

56. Flint M, Mullen S, Deatly AM, et al. Selection and characterization of hepatitis C virus replicons dually resistant to the polymerase and protease inhibitors HCV-796 and boceprevir (SCH 503034). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(2):401-411.
57. Fridell RA, Qiu D, Wang C, Valera L, Gao M. Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(9):3641-3650.
58. Dore GJ, Matthews GV, Rockstroh J. Future of hepatitis C therapy: development of direct-acting antivirals. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2011;6(6):508-513.
59. Poordad F, McCone Jr J, Bacon BR, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(13):1195-1206.
60. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(25):2405-2416.
61. Jacobson IM, Dore GJ, Foster GR, et al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2014;384(9941):403-413.
62. Kowdley KV, Lawitz E, Poordad F, et al. Phase 2b trial of interferon-free therapy for hepatitis C virus genotype 1. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(3):222-232.
63. He Y, Staschke KA, Tan S-L. HCV NS5A: a multifunctional regulator of cellular pathways and virus replication. *Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology*. 2006:267-292.
64. Gao M, Nettles RE, Belema M, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature*. 2010;465(7294):96.
65. Cheng G, Peng B, Corsa A, et al. 1172 antiviral activity and resistance profile of the novel HCV NS5A inhibitor GS-5885. *Journal of Hepatology*. 2012;56:S464.
66. Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, et al. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virology journal*. 2013;10(1):355.
67. Tamori A, Enomoto M, Kawada N. Recent advances in antiviral therapy for chronic hepatitis C. *Mediators of inflammation*. 2016;2016.
68. Rajyaguru S, Xu S, Hebner C, et al. Sofosbuvir selects the NS5B S282T mutation in vitro in genotype 1-6 replicons and is not cross-resistant to resistance associated variants selected by other classes of antiviral inhibitors. *Hepatology*. 2013;58:739A.

69. Danielsson A, Palanisamy N, Golbob S, et al. Transmission of hepatitis C virus among intravenous drug users in the Uppsala region of Sweden. *Infection ecology & epidemiology*. 2014;4(1):22251.
70. Besse B, Coste-Burel M, Bourgeois N, Feray C, Imbert-Marcille B-M, André-Garnier E. Genotyping and resistance profile of hepatitis C (HCV) genotypes 1–6 by sequencing the NS3 protease region using a single optimized sensitive method. *Journal of virological methods*. 2012;185(1):94-100.
71. Colson P, Brouk N, Lembo F, Castellani P, Tamalet C, Gerolami R. Natural presence of substitution R155K within hepatitis C virus NS3 protease from a treatment-naïve chronically infected patient. *Hepatology*. 2008;47(2):766-767.
72. Almuedo ZP. *Resistencia a los nuevos antivirales frente al virus de la hepatitis C*, Universidad Complutense de Madrid; 2014.
73. Vicenti I, Rosi A, Saladini F, et al. Naturally occurring hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor resistance-related mutations in HCV genotype 1-infected subjects in Italy. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(4):984-987.
74. Altunok ES, Sayan M, Akhan S, et al. Protease inhibitors drug resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis C. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;50:1-5.
75. Şanlıdağ T, Sayan M, Akçalı S, Kasap E, Buran T, Arkan A. Determination of drug resistance mutations of NS3 inhibitors in chronic hepatitis C patients infected with genotype 1. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2017;51(2):145.
76. Buti M, Esteban R. Management of direct antiviral agent failures. *Clinical and molecular hepatology*. 2016;22(4):432.

8. EKLER

EK-1: Etik Kurul Kararı



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Farklı HCV genotiplerinde NS3, NS5A ve NS5B bölgelerindeki mutasyonların belirlenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Ersin KARATAYLI			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Temel Biyoteknoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİL CİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Araştırması					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Mehmet MELLİ
İmza:

(Handwritten signature)

18 Eylül 2017



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Farklı HCV genotiplerinde NS3, NS5A ve NS5B bölgelerindeki mutasyonların belirlenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	ILAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:17-713-15	Tarih: 09 Kasım 2015		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın çalışmanın gerekece, amaç, saklısım ve yöntemleri dikkate alınarak melenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr. Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.U. Tıp Fakültesi	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"/>	<i>M. Mellî</i>
Prof.Dr. İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.U. Tıp Fakültesi	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"/>	<i>M. Soykan</i>
Prof.Dr. Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.U. Tıp Fakültesi	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"/>	<i>S. Öztürk</i>
Prof.Dr. Seher DEMİRER	Genel Cerrahi	A.U. Tıp Fakültesi	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"/>	<i>S. Demirer</i>
Prof.Dr. Şule ŞENGÖL	Nefroloji	A.U. Tıp Fakültesi	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"/>	<i>Ş. Şengöl</i>
Prof.Dr. İnci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.U. Tıp Fakültesi	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"/>	<i>İ. İlhan</i>
Prof.Dr. Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.U. Tıp Fakültesi	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"/>	<i>S. Sivri</i>
Prof.Dr. Zariife ŞENOCAK	Hukuk	A.U. Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Z. Şenocak</i>
Prof.Dr. Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.U. Tıp Fakültesi	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"/>	<i>B. Çakır</i>
Doç.Dr. A. Ruhi SOYLU	Biyofizik	H.U. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>A. Ruhi</i>
Doç.Dr. Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.U. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>D. Öztuna</i>
Doç.Dr. Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.U. Tıp Fakültesi	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"/>	<i>S. Koçak</i>
Yrd.Doç.Dr. Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.U. Tıp Fakültesi	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"/>	<i>N. Kutlay</i>
Uz.Dr. Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	A.U. Tıp Fakültesi	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"/>	<i>Ö. İlgili</i>
Mühübe SUTAY	İşletme	-	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>M. SUTAY</i>

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

M. Mellî
18 Kasım 2015
A.Ü. Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Başkanı BAYKAL KILIC
TIP FAKÜLTESİ
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer aldığı her sayfaya imza atmaktadır.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Esra Yurdcu

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 10.11.1983

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans: Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2001-2005)

Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Öğretmenliği
(2007-2009)

İş Tecrübesi

Kurumu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Görevi: Biyolog

Yılları: 2006-

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler

11. Ulusal Hepatoloji Kongresi, 2017, ‘‘Türkiye’deki Hepatit C virüs 1a ve 1b genotiplerinde NS3, NS5A ve NS5B bölgelerindeki antiviral direnç varyantları’’, sözlü bildiri sunumu



Akut ve Kronik Enfeksiyöz Hepatit

SS-23

TÜRKİYE'DEKİ HEPATİT C VİRÜS 1A VE 1B GENOTİPLERİNDE NS3, NSSA VE NSSB BÖLGELERİNDEKİ ANTI-VİRAL DİRENÇ VARYANTLARI

Esra Yurdau¹, Ersin Karataylı¹, Selma Gökahmetoğlu², Senem Ceren Karataylı³, Ramazan İdilman⁴, Cihan Yurdaydn⁵, Abdurrahman Mithat Bozdayn⁶

¹Ankara Üniversitesi Hıpatoloji Enstitüsü
²Erciyes Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
³Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bölümü
⁴Ankara Üniversitesi Hıpatoloji Enstitüsü/Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bölümü

Amaç: Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu tedavisinde kullanılan direkt ebi eden antiviraller (direct acting antivirals-DAA), HCV nin yapısal olmayan proteinlerinden NS3/NS4A, NSSA, NSSB bölgelerini hedeflemektedir. HCV'nin doğrulama mekanizması olmadan yüksek replikasyon kapasitesine sahip olması çok sayıda aminoasit değişikliğine neden olan viral genetik bir heterojenite oluşturmaktadır. Bu farklı varyantların anti-viral tedavi sürecinde seçilmeleri ilaç direncini belirleyebilmektedir. Dirençle ilgili olan aminoasit değişiklikleri 1b genotipi için NS3 bölgesinde Q80K, NSSA bölgesinde L31V, Y93H/N ve NSSB bölgesinde S282T dir. 1a genotipi için dirençle ilgili aminoasit değişiklikleri ise NS3 bölgesinde Q80K, NSSA bölgesinde M28T, Q30R, L31M/V, Y93H/N ve NSSB bölgesinde S282T dir. Bu çalışmanın amacı DAA'lara karşı gelişen dirençle ilgili olarak belirlenmiş amino asitlerin Türkiye'deki kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda fenotiplendirilmesidir.

Yöntem: 157 adet genotip 1b ve 30 adet genotip 1a olmak üzere toplam 187 hastanın plazma örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerin HCV RNA NS3, NSSA ve NSSB bölgeleri 2 tur PCR ile çoğaltıldı ve direkt DNA dizi analizi yapıldı (Big Dye Terminator kit 3.0, Applied Biosystem, ABI 310 Genetic Analyser, US). Elde edilen DNA dizilerinde ilgili bölgelerdeki nükleotid ve aminoasit değişiklikleri saptandı.

Bulgular: 157 HCV genotip 1b'li hastanın 143'ünde ve 30 HCV genotip 1a'lı hastanın tamamında NS3 bölgesi PCR ile çoğaltılırken, NSSB bölgesi için 118 HCV genotip 1b ve 29 HCV genotip 1a'lı hasta ve NSSA bölgesi için de 128 HCV genotip 1b, 24 HCV genotip 1a'lı hasta PCR ile çoğaltılabılmıştır. Yapılan DNA dizi analizi sonucunda HCV 1b genotipli 143 hastanın %4,2'sinde (6 hasta) ve HCV 1a genotipli 30 hastanın %23'ünde (7 hasta) NS3 bölgesinde Q80K varyantı görülmüştür. HCV NSSB bölgesinin S282 noksasında HCV 1b genotipli 118 hasta ve HCV 1a genotipli 29 hastanın hiçbirinde S282T varyantı gözlenmemiştir. HCV 1b genotipli 128 hastanın NSSA bölgesinde L31V varyantı görülmekle, Y93 noksasında %1,6'sında (2 hasta) Y93H, %0,8'inde (1 hasta) Y93Y/H varyantı görülmüştür. HCV 1a genotipli 24 hastada ise M28, Q30 ve Y93 noksalarında herhangi bir başka varyant görülmekle, L31 noksasında %4 (1 hasta) oranında L31L/M varyantı görülmüştür.

Sonuç: Tedaviye başlayacak kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda HCV genomundaki anti-viral hedeflerin DNA dizilemesi düşünülebilir. Bu araştırma sonucun da Türkiye'de genotip 1b ve 1a ya sahip olan kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda, klinik açıdan önemli olan NSSA direnç varyantları çok nadir olarak görülmüştür. Bu durum hastaların daha önce HCV'nin NSSA bölgesini hedefleyen DAA'ları kullanmadığını göstermektedir. Ayrıca HCV NSSB bölgesi S282T mutasyonlarını 1a genotipi ve 1b genotipi hastalarda hiç görülmekle, HCV genotip 1a'da NS3 Q80K mutasyonunu 1b genotipinden daha yüksek oranda saptanmaktadır.

44

Akut ve Kronik Enfeksiyöz Hepatit

SS-24

İKİ FARKLI ANTI-HEV ELISA KİTİNİN KARŞILAŞTIRILMASI VE TÜRKİYE'DE HEV SEROPREVALANSININ YENİDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Osman Yazar¹, Senem Ceren Karataylı², Güntüz Cengiz³, Ersin Karataylı⁴, Mehtap Kızılpınar⁵, Esra Yurdau⁶, Rabia Albayrak⁷, Aysel Güven⁸, Önder Arslan⁹, Ceren Karahan¹⁰, Banç Otlu¹¹, Hüseyin Güdücüoğlu¹², Selma Gökahmetoğlu¹³, Elife Berk¹⁴, Özlem Gıtmışoğlu¹⁵, Rüçhan Sertöz¹⁶, Cihan Yurdaydn¹⁷, Abdurrahman Mithat Bozdayn¹⁸

¹Ankara Üniversitesi Hıpatoloji Enstitüsü
²Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyometri ve Genetik Bilim Dalı
³Baskent Üniversitesi Patoloji Laboratuvar Teknikleri Bölümü
⁴Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı
⁵Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü
⁶İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
⁷Mıdıcın'da Yı Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
⁸Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
⁹Neçir Fazıl Sehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı
¹⁰Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
¹¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı-Ankara Üniversitesi Hıpatoloji Enstitüsü

Amaç: Bu çalışmada, ülkemiz laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan Dia.Pro (Milan, İtalya) ile yüksek duyarlılıkta çalıştığı gösterilmiş Wantai (Beijing, Çin) firmasına ait total anti-HEV ELISA ticari kiti ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın bir diğer amacı da Türkiye'de hepatit E virüs (HEV) seroprevalansının yeniden değerlendirilmesidir.

Yöntem: Gönüllü kan donörlerinden toplam 2011 serum örneğinin 807'si Ankara, 243'ü Kayseri, 200'ü Malatya, 284'ü İzmir, 200'ü Kahramanmaraş ve 277'si Van'dan toplanmıştır. 18-65 yaş arası donörlerin 1880'i (%93) erkek ve 131'i (%7)'i kadındır. Her bir örnek hem Dia.Pro hem de Wantai total anti-HEV ELISA kiti ile ticari firmanın önerileri doğrultusunda ALISEL tam otomatik ELISA cihazında çalışılmıştır. Ayrıca her iki kit için de duyarlılık testi yapılmıştır. İstatistiksel analiz yapılarak χ^2 (ki-kuare) testi kullanılmıştır. p<0,05 olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Dia.Pro sonuçlarına göre 228 (%11,34) pozitif, 1783 (%88,66) negatif bulunmuştur. Aynı örnekler için Wantai kitine göre 243 (%12,08) pozitif, 1768 (%87,92) negatif bulunmuştur. İki kit arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05). Kitlerin duyarlılık deneyi sonucuna göre Dia.Pro için 1/600 dilüsyon (0,16 IU/mL) eşik değeri üzerinde olan Wantai kitinde bu değer 1/700 (0,14 IU/mL) bulunmuştur. 2011 kişi içinden 37 kişi Wantai kitinde pozitif bulunup Dia.Pro kit ile çalışma sonucu negatif bulunmuş olup, 22 kişi Dia.Pro kitinde pozitif bulunup Wantai kit sonuçlarına göre negatif sonuç vermiştir. 206 kişi her iki kit için de pozitif sonuç vermiştir (%10,24). Sırasıyla Wantai ve Dia.Pro kiti ile elde edilen sonuçlara göre anti-HEV pozitiflik oranları şöyledir; Ankara: %12,55-%12,01, Kayseri: %7,81-%6,99, Malatya: %15,55-%14,5, İzmir: %9,65-8,07, Kahramanmaraş: %15,5-%14,5, Van: %12,99-%11,91. Buna göre en yüksek pozitiflik iki kit için ortalama %15 oranı ile Malatya ve Kahramanmaraş'da olup en düşük pozitiflik %7,4 ile Kayseri ilimizde görülmektedir.

Sonuç: Wantai kitii ülkemizde ilk defa değerlendirilmiş ve yaygın olarak kullanılan Dia-Pro kitii ile karşılaştırılmıştır. Buna göre iki ticari kit arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir. Türkiye'de farklı şehirlerde daha önce sağlıklı kişiler ve donörler üzerinde yapılan çalışmalarda anti-HEV pozitifliği oranı %3,9-%20 oranları arasında farklılık göstermektedir. Bu çalışmada seçilen şehirlerden Ankara ve Malatya dışında daha önce kan donörleri üzerinde bir anti-HEV seroprevalans çalışması yapılmamıştır. Ankara'da 1996 yılında yapılan çalışma sonuçlarına göre anti-HEV pozitifliği artmış görülmektedir (%7,6'ya karşı %12,55-12,01). Aynı şekilde Malatya'da 2001 yılına göre pozitiflik oranında artış söz konusudur (%9,7-%15) Bu farklılığın nedeninin kullanılan kitlerin duyarlılıklarına bağlı olabileceği gibi zamana bağlı çevresel faktör değişimleri de etkil olabilir.

17 - 21 Mayıs 2017