

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PEG-İNTERFERON + RİBAVİRİN TEDAVİSİ
BAŞARISIZ HCV GENOTİP 1 İLE ENFEKTE
KARACİĞER TRANSPLANT ALICILARINDA
TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASINDA VİRAL
GENOMDA ORTAYA ÇIKAN MUTASYONLARIN
İNCELENMESİ**

ÇAĞLA ÇİFTÇİ

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2016

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2011970058

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PEG-İNTERFERON + RİBAVİRİN TEDAVİSİ
BAŞARISIZ HCV GENOTİP 1 İLE ENFEKTE
KARACİĞER TRANSPLANT ALICILARINDA
TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASINDA VİRAL
GENOMDA ORTAYA ÇIKAN MUTASYONLARIN
İNCELENMESİ**

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇAĞLA ÇİFTÇİ

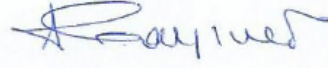
Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. A.Arzu Sayiner

İkinci Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Y. Hakan Abacıoğlu

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü Tarafından
2013.KB.SAĞ.025 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2011970058

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı öğrencisi Çağla Çiftçi Peg-İnterferon + Ribavirin Tedavisi Başarısız Hepatit C Virus Genotip 1 İle Enfekte Karaciğer Transplant Alıcılarında Tedavi Öncesi Ve Sonrasında Viral Genomda Ortaya Çıkan Mutasyonların İncelenmesi konulu Yüksek Lisans tezini 19.04.2016 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. A. Arzu SAYINER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.

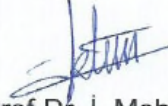
BAŞKAN



Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU

Izmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fak.

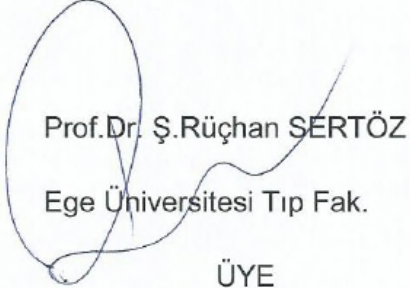
ÜYE



Prof. Dr. İ. Mehmet Ali ÖKTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.

ÜYE



Prof. Dr. Ş. Rüçhan SERTÖZ

Ege Üniversitesi Tıp Fak.

ÜYE



Doç. Dr. Ö. Alpay ÖZBEK

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.

ÜYE

Prof. Dr. İmre ALTUĞLU

Ege Üniversitesi Tıp Fak.

YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Cem ERGON

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.

YEDEK ÜYE

İçindekiler

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ	iii
ŞEKİL DİZİNİ	iv
KISALTMALAR	v
ÖZET	1
SUMMARY	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ	5
2.GENEL BİLGİLER	6
2.1. Hepatit C Virus.....	6
2.1.1. Giriş.....	6
2.1.2. Genotipler ve Epidemiyoloji.....	6
2.1.3. Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinler.....	9
2.1.4. Replikasyon Döngüsü.....	11
2.2.Patogenez ve İmmünite.....	12
2.2.1.Bağışık Yanıtlar.....	14
2.3. HCV Tanısı.....	18
2.3.1.Serolojik Testler.....	18
2.3.2.Nükleik asit Testleri (NAT).....	19
2.4. Sağıaltım.....	21
2.4.1.Peg-IFN ve Ribavirin Sağıaltımı.....	21
2.4.2.Doğırudan Etkili Antiviraller.....	23
2.4.2.1 Proteaz inhibitörleri ve direnç.....	23
2.4.2.2 Polimeraz inhibitörleri ve diğıer DEA'lar.....	26
2.5 HCV NS3 Proteininin Epitopları ve Patogenezdeki Olası Rollerini.....	31
2.6 HCV'nin Türümsü Doğası ve Ekstrahepatik Tutulumları.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Arağıtırmanın Tipi.....	35
3.2. Arağıtırmanın Yeri ve Zamanı.....	35
3.3. Arağıtırmanın Evreni ve Örneklemi.....	35

3.4. Çalışma Materyali	35
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	35
3.6. Veri Toplama Araçları	35
3.6.1 Kullanılan sarf malzemeleri ve cihazlar	35
3.6.3 Hastaların karakteristik özellikleri	36
3.6.4. Dizilenecek HCV Genomunun NS3 Bölgesi Eldesi	43
3.6.5 PZT ürünlerinin dizi analizi	48
3.6.6 Mutasyonların analiz edilmesi	48
3.6.7 Epitop Dizilerinin Korunmuşluk Analizi	49
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	49
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	50
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	50
3.10. Etik Kurul Onayı	50
4. BULGULAR	51
4.1 Polimeraz Zincir Tepkimesi	51
4.2 PZT Ürünlerinin Dizilimi	53
4.3 Mutasyonların Analizi	53
4.4 Epitop Dizileri	60
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
7. KAYNAKLAR	74
8. EKLER	88
8.1. Etik Kurul Onayı	88
8.2. Özgeçmiş	89
8.3. İzinler	91

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. 1994-2004 Yılları Arasında Yapılmış Çalışmalarda Türkiye’de HCV Genotip Dağılımları	7
Tablo 2. 2004-2014 Yılları Arasında Yapılmış Çalışmalarda Türkiye’de HCV Genotip Dağılımları	8
Tablo 3. Sağaltım Sonunda ve Sonrasında Cevap Kriterleri (132)	22
Tablo 4. Sağaltım Sırasında Yanıt Kriterleri (132)	22
Tablo 5. Proteaz İnhibitörlerine karşı oluşan dirençli varyantlar	27
Tablo 6. HCV g1 için NS3 proteinin insana ait bilinen CD8 ⁺ T- hücre epitoplari (103)	32
Tablo 7. Hastaların karakteristik özellikleri	37
Tablo 8. SA kodlu hastaya ait viral yük/zaman grafiği	38
Tablo 9. SK kodlu hastaya ait viral yük/zaman grafiği	38
Tablo 10. MB kodlu hastaya ait virak yük/zaman grafiği	39
Tablo 11. NK kodlu hastaya ait virak yük/zaman grafiği	39
Tablo 12. NE kodlu hastaya ait viral yük/zaman grafiği	40
Tablo 13. Çalışmaya alınan serum örneklerine ait zaman çizelgesi	42
Tablo 14. a,b,c ve d parçaları için kullanılan bağlanma sıcaklıkları	47
Tablo 15. Araştırma Planı ve İş süreleri	49
Tablo 16. SA kodlu hastanın direnç durumu	54
Tablo 17. SK kodlu hastanın direnç durumu	54
Tablo 18. MB kodlu hastanın direnç durumu	55
Tablo 19. NK kodlu hastanın direnç durumu	55
Tablo 20. NE kodlu hastanın direnç durumu	56
Tablo 21. NS3 bölgesi 1-181. kodonlar arasında hastalarda gözlemlenen non-sinonim mutasyonlar	57
Tablo 22. Analiz edilen epitoplari referans diziyile benzerlikleri	61
Tablo 23. Hastaların referans diziyile göre epitop benzerlik analizi	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. HCV'nin yapısal ve yapısal olmayan proteinleri (129'dan değiştirilerek alınmıştır.)	9
Şekil 2. Viral replikasyondöngüsü (97'den değiştirilerek alınmıştır.)	12
Şekil 3. HCV enfeksiyonunun doğal seyri (11'den değiştirilerek alınmıştır.)	13
Şekil 4. HCV'ye karşı oluşan doğal bağışık yanıt (125'den değiştirilerek alınmıştır.)	15
Şekil 5. Interferon ile uyarılan yollar ve HCV proteinleri ile etkileşimi (88'den değiştirilerek alınmıştır.)	16
Şekil 6. Antikor saptamada kullanılan farklı kuşak EIA testlerine ait antijenler (149'dan değiştirilerek alınmıştır.).....	19
Şekil 7. Ribavirin etki mekanizmaları 1-İmmünomodülasyon 2-IMPDPH (inosine-monophosphate-dehydrogenase) enzim inhibisyonu 3-Replikasyonunun direk inhibisyonu 4-Defektif virionlara yol açacak mutasyonlar (22'den değiştirilerek alınmıştır.)	21
Şekil 8. Kullanılan öncüller ve NS3 bölgesi üzerinde çoğalttıkları parçalar	44
Şekil 9. SA ve NE kodlu hastalara ait PZT ürünleri*	51
Şekil 10. SK kodlu hastaya ait PZT ürünleri*	51
Şekil 11. NK kodlu hastaya ait PZT ürünleri*	52
Şekil 12. MB kodlu hastaya ait PT ürünleri*	52

KISALTMALAR

HCV	: Hepatit C Virus
PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
RNA	: Ribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dsDNA	: Çift İplikli Deoksiribonükleik Asit
HSK	: Hepatosellüler Karsinoma
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
IRES	: <i>Internal Ribosome Entry Site</i>
ORF	: Açık Okuma Bölgesi (Open Reading Frame)
EIA	: Enzyme Immunoassay
TMA	: Transkripsiyon Aracılı Çoğaltma
REA	: Restriksiyon Enzim Analizi
IFN	: Interferon
Peg-IFN	: Pegile Interferon
RBV	: Ribavirin
HVR-1	: Hipervariable region
KVY	: Kalıcı Viral Yanıt
HVY	: Hızlı Viral Yanıt
EVY	: Erken Viral Yanıt
PKR	: Çift iplikli RNA'ya bağımlı protein kinaz
PRR	: <i>Patogen recognition receptors</i>
TLR	: <i>Toll Like Receptor</i>
UTR	: Kodlanmayan bölge (Untranslated Region)

ER	: Endoplazmik Retikulum
CD81	: Cluster of Differentiation 81
CLDN-1	: Klaudin-1
OCLN	: Oklüdin
DEA	:Doğrudan Etkili Antiviral
NS	: <i>Non-Structural</i>
Pi	:Proteaz İnhibitörü
KN	:Karaciğer Nakli
ISDR	: <i>Interferon sensivity determining region</i>
RbRp	: RNA bağımlı RNA polimeraz
ALT	: Alanin Amino Transferaz
AST	:Asparjin Amino Transferaz
CTL	: Sitotoksit T Lenfosit
PBMC	: Periferel Mononükleer Kan Hücreleri
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
PAMP	: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
VISA	: <i>Virus-Induced Signaling Adapter</i>
MAVS	: <i>Mitochondrial Antiviral Signaling Protein</i>
ISG	:İnterferon ile Stimüle olan Gen
NAT	:Nükleik Asit Tabanlı
FDA	:Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
iNOS	: İndüklenebilir Nitrojen Sentaz
M-MuLV	: <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
<i>in vitro</i>	: Canlı Dışında
<i>in vivo</i>	:Canlı İçinde

ÖZET

PEG-İNTERFERON + RİBAVİRİN TEDAVİSİ BAŞARISIZ HCV GENOTİP 1 İLE ENFEKTE KARACİĞER TRANSPLANT ALICILARINDA TEDAVİ ÖNCESİ VE SONRASINDA VİRAL GENOMDA ORTAYA ÇIKAN MUTASYONLARIN İNCELENMESİ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji A.D

Çağla ÇİFTÇİ

cagla.ciftci@ogr.deu.edu.tr

NS3-NS4A serin proteaz,kronik hepatit C virüs enfeksiyonu için geliştirilmekte olan direk etkili antiviral (DEA) ilaçların temel hedeflerinden biridir.

HCV enfeksiyonu sırasında lökosit hücre antijenleri tarafından oluşturulan seçici baskının sonucu olarak, viral genomda yüksek seviyede nükleotit mutasyonu gözlenmekte ve viral kaçış mutasyonlarının meydana çıkmasına neden olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, proteaz inhibitörleri yönünden naif, HCV genotip 1b ile enfekte karaciğer alıcılarında, daha önce proteaz bölgesinde ilaç direnciyle ilişkilendirilmiş amino asit değişimlerini ve CTL epitoplarındaki değişimleri karakterize etmektir.

Dirençle ilişkilendirilen varyantlar 3 hastada bulunmuştur (3/5). Toplam 14 serum örneğinde 3 farklı (155G,168A ve 168G) dirençli varyant bulunmuştur. Sonuçlarımız, HCV ile enfekte ve proteaz inhibitörü kullanmayan karaciğer organ alıcılarında kendiliğinden oluşan dirençli varyantların varlığını göstermiştir.

İki farklı veri bankasından NS3 bölgesinde bulunan ve HCV genotip 1 olarak bildirilen CTL epitopları indirilmiştir. Transgenik memeli hücrelerinden gelen epitoplar ve HLA tipi belirsiz olanlar dışlanmıştır. Beş hastadan elde edilen 14 serum örneğinin CTL epitoplarının korunmuşluk oranları %28 ile %57.3 arasındadır.

HCV ile enfekte karaciğer organ alıcılarında kendiliğinden oluşan dirençli varyantların proteaz inhibitörleriyle üçlü sağaltıma başlanmadan önce tanımlanması, sağaltıma yanıtı tahmin etmede yardımcı olabilir. Bağışık yanıtı kaçış ve ilaç

direnci profillerinin karakterizasyonu, kişinin ilaç rejiminin belirlenmesinde önemli bilgiler sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: HCV, karaciğer nakli, proteaz inhibitörleri, direnç mutasyonları, CTL epitopları



ABSTRACT

ANALYSING OF THE VIRAL GENOME MUTATIONS IN BEFORE AND AFTER TREATMENT SAMPLES OF HCV GENOTYPE 1 INFECTED LIVER ALLOGRAFT RECIPIENTS THAT DID NOT RESPOND TO THE PEGYLATED INTERFERON+RIBAVIRIN THERAPY

Dokuz Eylul University Institute of Health Sciences, Microbiology Department

Çağla ÇİFTÇİ

cagla.ciftci@ogr.deu.edu.tr

Several new direct-acting antiviral drugs are in development for chronic hepatitis C viral infection and NS3-NS4A serine protease have been one of the major target. HCV variants displaying drug-resistant phenotypes have been observed both in vitro and clinical trials.

As a consequence of selective pressure exerted by the host immun leukocyte antigen (HLA)- restricted immun responses during HCV infection, a high rate of nucleotide mutations in the viral genome is observed which leads to the emergence of viral escape mutations. The aim of this study was to chracterize amino acid changes at the positions associated with resistance to protease inhibitors and the changes in the CTL epitopes, in protease inhibitor naive liver allograft recipients infected with HCV genotype 1b.

Resistance associated variants were found in 3 patients (3/5). Three different resistance associated variants (155G,168A and 168G) were observed in 14 serum samples. Our results demonstrated existing of naturally occurring resistance variants in HCV infected liver allograft recipients .

CD8⁺ cell epitopes for NS3 region that are specified as HCV genotype 1 were downloaded from public databases.Epitopes from HLA transgenic mammalian cells were excluded. Samples were analysed and epitopes conservancy rates of 14 samples were between 28%-57.3%.

Identification of naturally occurring drug-resistance variants in HCV infected liver allograft recipients before triple therapy could assist to predict responses therapy outcomes. Characterization of immun escape and drug resistance profiles may provide important information defining an individual's drug regimen.

Keywords: HCV, liver transplantation, protease inhibitors, resistance mutations, CTL epitopes



1.GİRİŞ VE AMAC

Transplantasyon öncesinde saptanabilir viral yükü olan hastaların hemen tamamında karaciğer allograftı Hepatit C virüs (HCV) ile yeniden enfekte olmaktadır (32). Hastaların %75-90'da enfeksiyon kronikleşmekte ve %5-30'unda beş yıl içinde siroz gelişmektedir (32). Allograft enfeksiyonlarında PEG-interferon + ribavirin sağaltımına yanıt oranı %30-45 dolayındadır (109). Doğrudan etkili antivirallerin (DEA), bu hastaların sağaltımına önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir (109). Bu ilaçlardan iki tanesi, NS3 proteaz inhibitörleri bocaprevir ve telaprevir, kullanıma girmiştir. Ne var ki, bu ilaçların transplant hastalarında kullanımına ilişkin bilgi son derece sınırlıdır. Literatürde, proteaz inhibitörlerine dirençli varyantların sağaltım öncesinde ortaya çıktıkları ve ilaçların seçici baskısı altında dirençli varyantların seçildiği bildirilmektedir (100). Söz konusu dirençli varyantların ortaya çıkması HCV'nin türümsü doğası ile ilgilidir. Türümsüler (quasispecies) bir yandan virusun yüksek hızda replikasyonu, diğer yandanda viral polimerazın hata düzeltme işlevinin olmaması ile ilişkilidir. Bu şekilde ortaya çıkan türümsü popülasyonu içindeki mutantlar, bağışık yanıtlar ve ilaç gibi baskıların varlığında seçilerek ilaca dirençli veya bağışık yanıtlardan kaçabilen varyantların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Allograft enfeksiyonu gelişen transplant hastalarında yapılan çalışmalar, post-transplant birinci haftadan itibaren HCV RNA düzeylerinin giderek arttığını ve transplantasyon öncesi düzeylerin 10-100 katına çıktığını göstermektedir (13). Bu artışa karşın, gerek transplantasyona bağlı genetik darboğaz gerekse de immunosüpresyona bağlı bağışık yanıtların seçici baskısı ortadan kalktığından/azaldığından türümsü çeşitliliğinde bir azalma olmaktadır. Organ naklini takip eden bir yıl içinde , daha homojen viral türümsü popülasyonuna sahip olan hastalarda hastalığın daha şiddetli tekrar ettiği görülmüştür (19).

Bu araştırmada HCV enfeksiyonu nedeniyle karaciğer nakli yapılan hastalarda organ nakli sonrasında uygulanan antiviral sağaltımdan önce ve sonra viral genomda ortaya çıkan değişikliklerin incelenmesi hedeflenmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit C Virus

2.1.1. Giriş

Hepatit C virüsü pozitif yönelimli tek iplikli bir RNA taşıır. *Flaviviridae* ailesinde yer alır ve ailenin tek virüsüdür (7). Virüs, 1989 yılında A ve B hepatiti olmayan hastaların serumları ile enfekte edilmiş şempanzelerin plazmalarından klonlanarak tanımlanmıştır (14). Moleküler klonlama teknikleri kullanılarak tanımlanan ilk virüştür. Küresel yapılı bir zarfa sahiptir .

HCV enfeksiyonları %80'lere varan yüksek kronikleşme riski, siroz ve hepatoselüler karsinom gibi ciddi komplikasyonlara yol açması nedeniyle ülkemizde ve dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur (80). Dünyada 130-150 milyon insanın HCV ile kronik olarak enfekte olduğu tahmin edilmektedir (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>).

2.1.2. Genotipler ve Epidemiyoloji

HCV genomdaki değişikliklere dayalı olarak tiplere ayrılmıştır. Dünyanın farklı coğrafi bölgelerine dağılmış 7 ana genotipi bulunmaktadır. Genotipler arası karşılaştırmalarda nükleotit pozisyonlarındaki farklılık %31-34 ve kodlanan proteinlerin sekanslarındaki farklılık %30'dur. Genotipler 1,2,3 gibi Arap rakamlarıyla, alt tipler ise a,b,c gibi küçük Latin harfleriyle gösterilmektedir (59).

Genotiplerin coğrafi dağılımı birbirinden farklıdır. Genotip 1a, 1b, 2a, 2b genel olarak dünyada yaygındır. Avrupa'da ve Japonya'da genotip 2 ve 3 daha yoğun olarak bulunmaktadır.Genotip 4, en sık Mısır ve Ortadoğu'da görülürken, Güney Afrika'da genotip 5 baskın olarak göze çarpmaktadır.Hong Kong ve diğer Güney Doğu Asya ülkelerinde genotip 6 yoğun olarak görülmektedir. Genotip 7 ise 2012 yılında ilk defa Kanada'dan bildirilip tiplendirilmesi yapılmıştır.

Türkiye'de HCV prevalansı %1-1.9 arasındadır. 1994-2004 yılları arasında yapılmış ve ulaşılabilen çalışmalara göre baskın genotip 1b'dir. Bunu sırasıyla genotip 2,4 ve 3 izlemektedir (Tablo 1). 2004-2014 yılları arasında Türkiye'de yapılan çalışmalarda genotip 1b hala baskın genotip olmakla birlikte, bildirilen genotip 2,3 ve 4 olgularının sayıları artmıştır. (Tablo 2).

Tablo 1. 1994-2004 Yılları Arasında Yapılmış Çalışmalarda Türkiye’de HCV Genotip Dağılımları

Çalışma grubu (n)	GENOTİPLER						K *	AN*
	1a	1b	2	3	4			
Dusheiko ve ark.		1						
Viazov ve ark.	17		1					
Abacioğlu ve ark.	17	67	3		2			
Akkız ve ark.	1	63						
Uzunlumoğlu ve ark.	4	35						
Sönmez ve ark.		41				3	15	
Kendal ve ark.		28						
Bozdayı ve ark.	9	57	4	1	4			
Okamoto ve ark.	2	32		2				
Tuncer ve ark.	12	42	3		1			
Yarkın ve ark.	9	51	2					
Bozdayı ve ark.	2	18						
Türkoğlu ve ark.	14	166	9	10	6	12	22	
Özacar ve ark.	17	138	4	1	2	8		
Erensoy ve ark.	15	30						
Gökahmetoğlu ve ark.	2	93						
Bozdayı ve ark.	51	334	10	3	3			
Toplam (n=1497)	142	1196	36	17	18	23	37	
	%	9.5	79.9	2.4	1.1	1.2	1.5	2.5

*K: Karışık; AN: Altıplendiremeyen

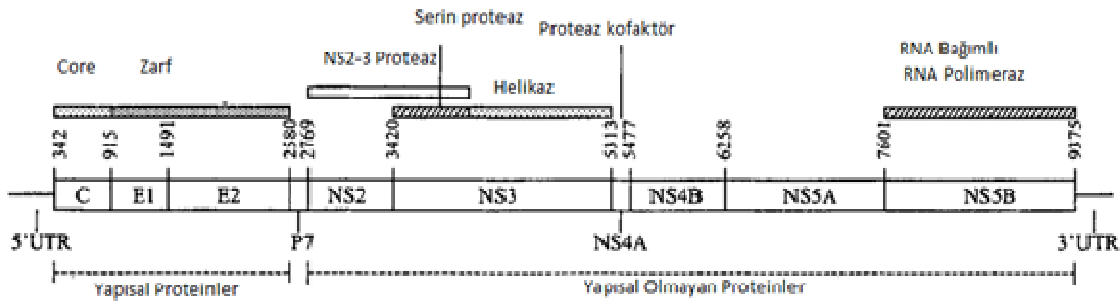
Tablo 2.2004-2014 Yılları ArasındaYapılmış Çalışmalarda Türkiye'de HCV Genotip Dağılımları

Çalışma grubu (n)	GENOTİPLER						AN*
	1a	1b	2	3	4	K*	
Seçuk ve ve ark.	32	89			4		
Altındış ve ark.	3	49	1				
Çil ve ark.	5	16		1			
Gökahmetoğlu ve ark.	2	55					
Ural ve ark.		80					
Altıju ve ark.	34	301	3	5	2		
Özbek ve ark.		65	2	4			
Şanlıdağ ve ark.	2	90	2		5		
Çelik ve ark.	16	157	2	3			
Aktaş ve ark.	1	38					5
Kalaycı ve ark.	6	19			4		
Keskin ve ark.	6	82	7	6	1	3	
Küçüköztas ve ark.	1	40	2	5	4		
Süleymanlar ve ark.	3	26					13
Gökahmetoğlu ve ark.	5	77	4		52		
Karlıgil ve ark.	5	40	4	1	1		
Sağlık ve ark.	31	182	10	33	3		1
Sağlık ve ark.	62	263	15	47	7	1	
Çekin ve ark.	19	90	5	17	3	4	
Öztürk ve ark.	12	455	76	85	11		
Toplam(n=3464)	254	2357	133	207	97	8	19
%	7.33	68.0	3.8	6.0	3.0	0.2	0.5

K:Karışık;AN: Alttiplendirilemeyen

2.1.3. Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinler

HCV genomu yaklaşık 9600 bp'den oluşur. Genomun 5' ve 3' uçlarında herhangi bir proteini kodlamayan bölgeler vardır (*NCR: non-coding region* ya da *UTR: untranslated region*). Genomun ribozoma tutunarak herhangi bir sinyale gerek duymaksızın okunmasını sağlayan IRES (*Internal ribosomal entry site*) bölgesi 5'NCR'nin içinde yer alır. Bu iki ucun arasında 9377 baz uzunluğunda ve, 3011aa kodlayan tek bir açık okuma penceresi (*ORF: open reading frame*) bulunur. Sentezlenen tek bir poliprotein hem konak proteazları hem de virusun kendine ait proteazlar ile kesilerek 10 adet olgun protein oluşturulur. Bu proteinlerden yapısal olanlar core, E1, E2, ve p7; yapısal olmayanlar ise NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B'dir (Şekil 1).



Şekil 1.HCV'nin yapısal ve yapısal olmayan proteinleri (129'dan değiştirilerek alınmıştır.)

2.1.3.1. Yapısal Proteinler

Konağa ait sinyal peptit peptidazlar tarafından kesilerek ayrılan yapısal proteinlerin ilki özyapı proteindir (core). Nükleokapsid oluşumunun en temel elemanıdır. Yapıya katılmasının yanında konak hücre transformasyonu, apoptozu ve lipid metabolizmasında önemli rol oynar. Core proteinini eksprese eden transgenik farelerde hepatosellüler karsinom (HSK) geliştiği ve core genindeki bazı mutasyonların HSK riskini arttırdığı belirtilmiştir (7).

Zarf proteinleri (E1 ve E2) yüksek oranda glikozillenmiş tip 1 transmembran proteinleridir. E1 ve E2 virusun konak hücreye girişi için gerekli proteinlerdir. Girişte E2'nin hücre reseptörlere bağlanma, E1'in ise füzyonda görevi olduğu düşünülmektedir (26). E2, virusun en değişken bölgesidir. Aşırı değişken (*hypervariable, HVR*) olarak adlandırılan üç bölge, HVR 1, 2, 3 'ü içerir. HVR-1 tek olmamakla birlikte HCV için esas nötralize edici epitoptur (148).

P7, yapısal proteinleri kodlayan bölgenin sonunda yer alan 63 aa'lık hidrofobik bir proteindir. Tüm yapısal ve işlevsel özellikleri aydınlatılmamış olmasına karşın iyon kanalı etkinliğine sahip ve virusun bir araya gelmesinde (*assembly*) etkin olduğu bildirilmektedir (119, 130).

2.1.3.2. Yapısal Olmayan Proteinler

Virusun yapısal olmayan proteinleri (*NS: non-structural*) NS2–NS5 olarak sıralanır. NS2 ve NS3'ün amino-terminal domaini birlikte NS2-3 proteazı oluştururlar. Bu proteaz NS2/NS3 bölgesinin kesimini katalizler (7)

NS3, 67 kDa ağırlığında iki işlevli bir moleküldür. Amino terminali, serin proteaz işlevi göstererek NS3/NS4A, NS4A/B, NS4B/NS5A ve NS5A/B bölgelerinin kesiminden sorumludur. Karboksil terminalini ise NTPase/helikaz aktivitesi ile HCV genomunun translasyonu ve replikasyonu için oldukça önemli bir role sahiptir (7). Bunların yanı sıra NS3'ün konak hücrede protein kinaz-A aracılı sinyal yollarının inhibisyonu ya da hücre transformasyonu ile de ilişkili olduğu düşünülmektedir. NS3 proteaz iyi bir sağaltım hedefidir. Şu an birçok ülkede ve Türkiye'de kullanımı başlanmış olan yeni nesil antivirallerden telaprevir ve boceprevir, birer proteaz inhibitörüdür (Pİ).

NS4, 54 aa uzunluğundadır. NS3 proteazın kofaktörüdür ve verimli bir poliprotein işleme için gereklidir. NS3 ve NS4A arasındaki etkileşim NS3'ün merkezi ile NS4A'nın C-terminali aracılıdır. NS4A aynı zamanda NS5A'nın fosforillenmesi için de gereklidir ve NS5A ile doğrudan etkileşime geçebilir (3).

NS4B, 27kDa ağırlığında, küçük, hidrofobik ve HCV replikasyon kompleksin endoplazmik retikulum (ER) membranında oluşması sırasında görev alan integral bir membran proteindir. Yapısal olmayan proteinlerin ER üzerinde yerleşmesine yardımcı olur. NS4A ile etkileşime geçer ve dolaylı olarak da NS3 ve NS5B ile de etkileşime girmiş olur (3).

NS5A hidrofilik, yüksek oranda fosforillenmiş bir proteindir. Fosforilasyonu konak hücre kinazları aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Viral replikasyonda hücre sinyal yollarında ve interferon yanıtında önemli rol oynar. Replikasyon kompleksinin oluşması için NS5A'nın varlığı gerekmektedir. Bu protein interferon tedavisinin başarılı olup olmayacağı için öngörülebilmesi için kritik bir öneme sahiptir.

Protein üzerinde çift iplikli RNA'ya bağımlı protein kinaz (PKR) ile etkileşen "İnterferon duyarlılığını belirleyen bölge" (*ISDR: Interferon sensitivity determining region*) olarak adlandırılan bir bölge bulunur. Bu bölgenin IFN- α sağaltımına karşı virüsün duyarlı ya da dirençli olacağını öngörmeye kullanılabileceği düşünülmektedir (23, 31). Bunun yanı sıra çok sayıda hücresel protein ile etkileşime girerek konak hücre sinyal ileti yollarını kontrol eder, apoptozu baskılar ve hücre farklılaşmasını etkiler. NS5A doğrudan etkili antivirallerin hedefleri arasındadır.

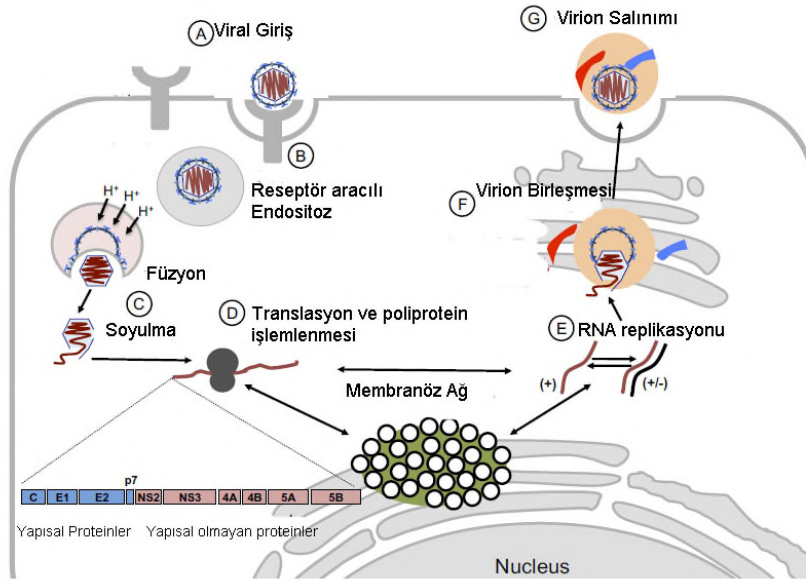
NS5B viral proteinlerin sounucusudur. 65kDa ağırlığında, RNA bağımlı RNA polimeraz (RbRp) etkinliğindedir. Diğer tüm pozitif iplikli RNA viruslarının RbRp'ları gibi NS5B de GDD motifi içermektedir (58). Enzimin yapısal organizasyonu tipik sağ el görünümündedir. Enzimin hata düzeltme aktivitesinin olmaması HCV türümsülerinin ortaya çıkmasına katkı sağlar. NS5B, aktivitesi sırasında hücresel bir protein olan siklofilin A'ya (Cyp A) bağlanır. Enzimin bu etkileşiminden faydalanılarak, inhibitör etkili siklofilin analogları geliştirilmiştir.

2.1.4. Replikasyon Döngüsü

Viral hücre döngüsünün ilk aşaması hücreye giriştir. Bu aşama HCV için oldukça yavaş ve karmaşık bir süreçtir. Hücreye alınmada karaciğer hücre reseptörlerinden glikozaminoglikanlar, CD81, SR-BI (*Scavenger receptor class B type I*), klaudin ailesi üyeleri (CLDN1,6 ve 9), mannoz-bağlayan lenktinlerden DC-SIGN ile L-SIGN'in reseptör ya da yardımcı reseptör oldukları kabul edilmektedir. HCV hücreye girmeden önce heparan sülfat glikosaminoglikanlar, C-lectinler veya LDL-R aracılığı ile hücre yüzeyinde yoğunlaşır ve ardından viral reseptörler aracılığı ile hücreye girişi gerçekleşir. Viral partikül endozom ile hücre içine alındıktan sonra erken endozomdaki düşük pH yardımıyla endozomal zarlar ile viral peptitlerin kaynaşması (füzyon) sonucunda kapsit soyulması gerçekleşir. Viral RNA böylelikle sitozole salınmış olur (91).

HCV genomunun 5' ucunda kep bulunmaz. Bu yüzden HCV RNA'nın translasyonu kep aracılı mekanizma yerine 5'UTR'de bulunan IRES aracılığıyla gerçekleşir (7, 130). 40S ribozomal alt birim ve eIF3 bağımsız olarak IRES'e bağlanabilir. Daha sonra bu yapıya 60S alt birim bağlanarak protein translasyonu başlatılır. Çeşitli konak hücre elementleri ile viral öz yapı proteini, NS5A ve 3'UTR de IRES 40S alt birim kompleksine bağlanarak translasyonu kontrol ederler (40).

Translasyon granüllü ER'da gerçekleşir. Sentezlenen tek bir poliprotein, yapısal ve yapısal olmayan proteinleri oluşturmak üzere hem konak hücre proteazları hem de viral proteazlar tarafından kesilir. RdRp NS5B negatif iplikli RNA sentezleyerek pozitif yönelimli RNA'ları replike etmek için gereken kalıbı oluşturur. Replikasyon ve translasyon sonrası işlemler, yapısal olmayan viral proteinler ve replikasyon kompleksi olarak adlandırılan konak hücre proteinlerinden oluşmuş membranöz ağ içinde gerçekleşir. Genomun kapsül içine alınması ER'da gerçekleşir. Nükleokapsidler zarf içine alınıp olgunlaştırılarak golgi aygıtına gönderilirler. Olgun virus ekzositoz ile hücre dışına salınır. Virüsün yaşam döngüsü şekil 2'de gösterilmiştir.



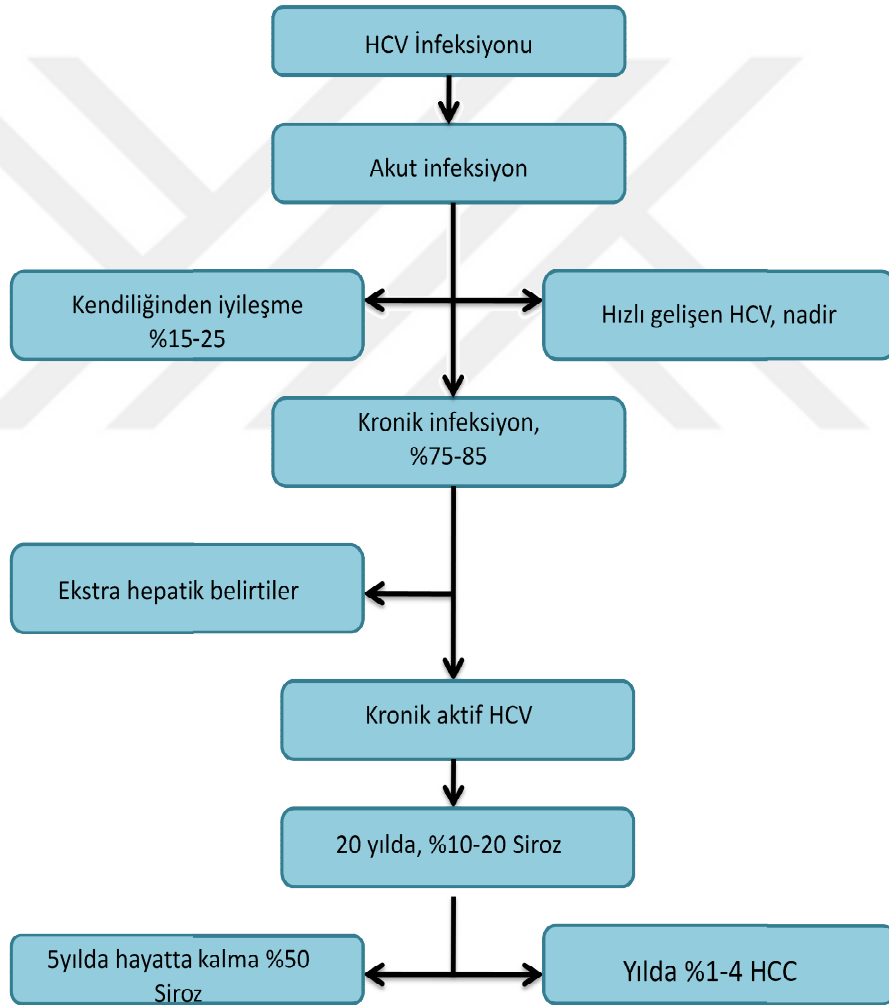
Şekil 2. Viral replikasyon döngüsü (97'den değiştirilerek alınmıştır.)

2.2. Patogenez ve İmmünite

HCV bulaşı sonrası enfeksiyonun ilk altı ayı akut evredir ve bu evrede hastaların %10-25'i kendiliğinden iyileşir. İnkübasyon periyodu ortalama 7-8 hafta olmakla birlikte bu süre 2-26 hafta arasında değişebilmektedir. Akut fazda hastalığın tanısının konması güçtür. Prodromal belirtiler nadirdir ve vakaların sadece %20'sinde sarılık mevcuttur. Akut faz, karaciğer enzimlerinden alanin amino transferaz (ALT) ve asparjin amino transferaz (AST) enzimlerinin karaciğer hücre hasarına bağlı olarak artmasıyla tanımlanabilir. Akut fazda ALT seviyesinin yükselmesi genellikle kısa sürede ve fark edilmeden gerçekleşir. Bu evre, genellikle virüsün en yüksek titreye

ulaştığı dönemdir ancak viremi seviyesi her zaman hastalığın şiddetiyle korelasyon göstermez (90).

Akut fazdaki olguların %75-85'i, yükselen anti HCV antikorlarına karşın saptanabilir HCV RNA düzeyleriyle ile tipik kronik HCV gelişimiyle sonuçlanır (52). Kronik HCV'nin histopatolojik belirtisi karaciğer fibrozudur. Fibroz oluşumunda virusun doğrudan etkisi olmadığı, HCV'ye özgü immünolojik yanıtların büyük oranda hücre ölümünden sorumlu olduğu düşünülmektedir (15, 73).HCV enfeksiyonunun doğal seyri Şekil 3.'de gösterilmiştir.



Şekil 3. HCV enfeksiyonunun doğal seyri (11'den değiştirilerek alınmıştır.)

2.2.1.Bağışık Yanıtlar

2.2.1.1 Doğal bağışık yanıtlar

HCV enfeksiyonu öncelikle interferon (IFN) I üretimini ve IFN aracılı yanıt yollarını baskılayıcı etki gösterir (108).

Doğal bağışık yanıtlar patojen aracılı moleküler paternler (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*; PAMP) tarafından başlatılır. Bu paternler doğal bağışık yanıt hücrelerinin patern tanıyıcı reseptörleri (*Pattern- Recognition Receptors*; PRR) tarafından tanınırlar. PRR'ler beş ana grupta sınıflandırılırlar.

1. Toll benzeri reseptörler (*Toll-like receptors*; TLR)
2. C-tipi lektin benzeri reseptörler (*C-type lectin-like receptors*; CLR)
3. Nükleotit bağlayan oligomerizasyon kangallı protein benzeri reseptörler (*Nucleotide-binding oligomerization domain NOD protein-like receptors*; NLR)
4. RIG-I benzeri reseptörler (*RIG-I like receptors*; RLR)
5. AIM-2 benzeri reseptörler (*Absence in melanoma 2-like receptors*; ALR)

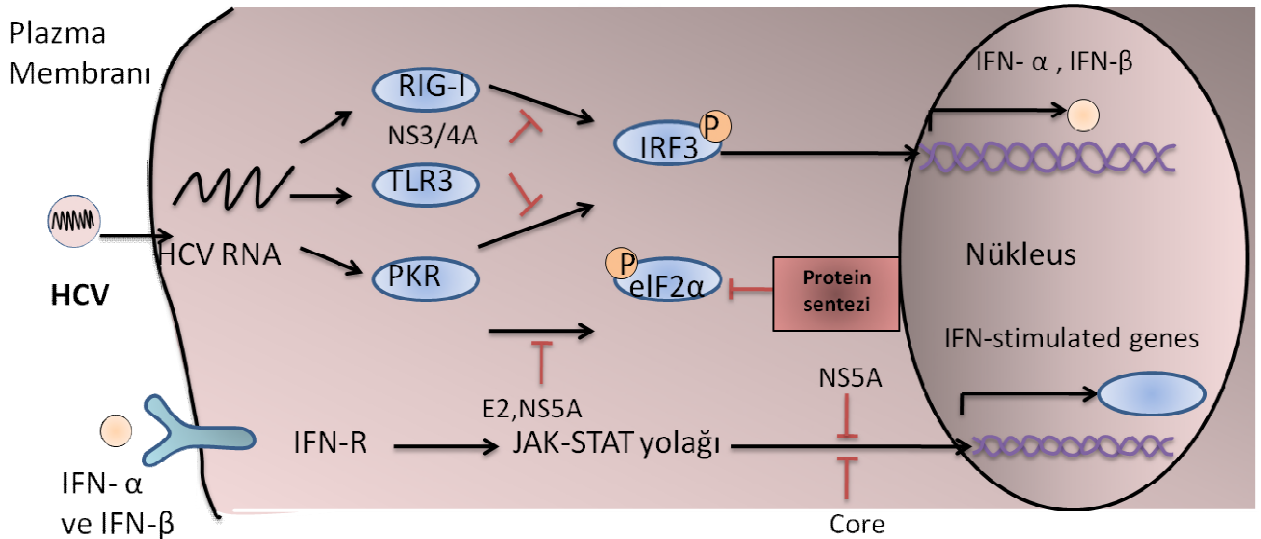
Reseptörlerin fonksiyonları çoğunlukla buldukları hücrelerdeki lokalizasyonlarına göre regüle olur. RLR'ler ve NLR'ler pek çok hücrenin sitoplazmasında bulunurken TLR'ler endozomlarda ve hücre yüzeyinde bulunurlar.

Herhangi bir PAMP'ın, PRR'lerce tanınmasının ardından farklı ara moleküllerin rol oynadığı sinyal ileti mekanizmaları harekete geçerek, fagositik hücrelerin aktivasyonu ve inflamatuvar yanıt için gerekli sitokin ve kemokinlerin üretimi gerçekleşir.

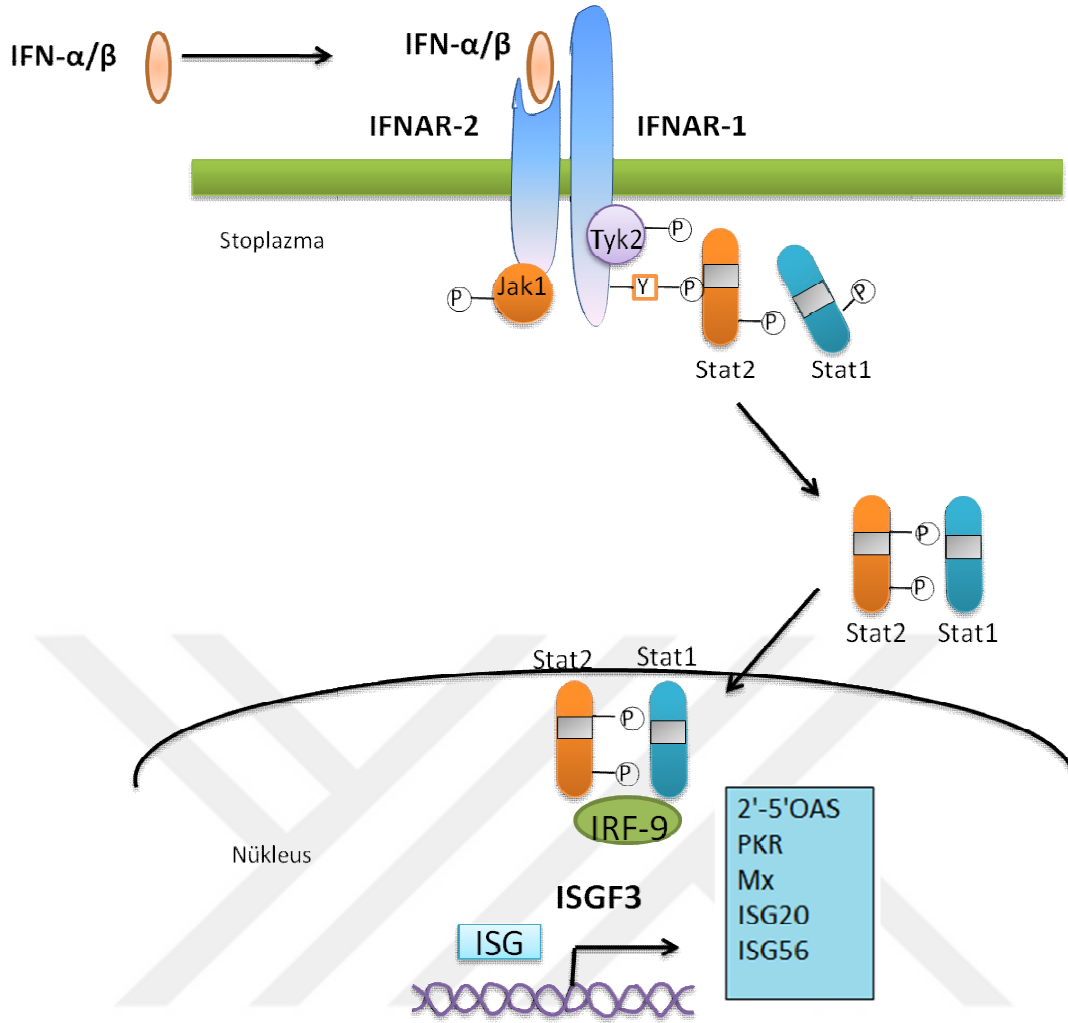
NLR'lerin büyük çoğunlukta bakteriyel PAMP'larla ilişkili oldukları düşünülmekte antiviral yanıtlardaki rolleri henüz tam olarak bilinmemektedir (51). TLR'ler antiviral tanımda görev alırlar, bunlara TLR2,3,4,7/8 dahildir. Bunların aktivasyonu proinflamatuvar sitokinlerin ve IFN- α 'nın üretilmesini etkiler (42). RLR'ler hepatositleri de içine alan büyük bir hücre grubu tarafından eksprese edilirler. RLR'ler, HCV enfeksiyonunun birincil stoplazmik dedektörleri olarak iş görürler (54). HCV'ye karşı oluşan doğal bağışık yanıt Şekil 4.'de anlatılmıştır.

Hepatositlerde, Toll-like reseptör 3, (TLR-3) ds-RNA yapılarını, TLR-2 HCV proteinlerini, RNA helikazlardan RIG-I, HCV 3'UTR'nin poliüridin motifini tanıyarak

sinyal ileti mekanizmalarının uyarılmasını sağlar. Aktivasyon sonrası TBR3 TRIF (Toll–IL-1 receptor domain–containing adaptor inducing IFN- β) adaptör molekülünü ve RIG-I ise IFN- β promoter stimulator protein 1 (IPS-1; CARD adaptor inducing IFN- β 'CARDIF', *virus-induced signaling adapter* 'VISA' ve mitochondrial antiviral signaling protein 'MAVS') adaptör molekülünün aktivasyonunu sağlar. Her iki süreç bir dizi reaksiyonla devam ederek IRF3 (*IFN regulatory factor 3*)'ün çekirdeğe taşınması ve IFN- β sentezi ile sonuçlanır. Salınan IFN- β hem salındığı hücrede hemde komşu hücrelerdeki IFN- α/β reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma JAK/STAT yolağını aktive eder. STAT1 ve STAT2 fosforile olarak çekirdeğe geçer ve orada IRF-9 ile birleşerek ISGF-3 denen transkripsiyon faktörünü oluşturur. ISGF-3 çok sayıda IFN ile stimüle olan genin (ISG) transkripsiyonuna neden olur. Bu ISG'lerin ürünlerinden başlıcaları viral ve hücresel RNA'yı yıkan 2',5' oligoadenilat sentaz (OAS), RNase-L ve ds RNA zincirlerindeki adenozin residülerini inozin rezidülerine dönüştürüp viral RNA yapılarını mutasyona uğratan RNA özgül ADAR1 proteindir. Bu genler aynı zamanda viral ve konak hücre RNA'larının translasyonunu inhibe eden P56 ve PKR'yi de kapsar. ISG'lerin induksiyonu IFN cevabını artırır. Bir ISG olan IRF7 IFN- α alt tipini stimüle eder (55, 108, 112). Interferon ile uyarılan yollar Şekil 5.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. HCV'ye karşı oluşan doğal bağışık yanıt (123'den değiştirilerek alınmıştır.)



Şekil 5. Interferon ile uyarılan yollar ve HCV proteinleri ile etkileşimi (87'den değiştirilerek alınmıştır.)

2.2.1.2 Hücresel bağışık yanıtlar

HCV'ye özgül T hücreler, enfeksiyonun ortadan kaldırılması için kritik öneme sahiptir. Özellikle HCV'ye özgül CD4+ T hücreleri başarılı bir özgül bağışık yanıt için çok önemlidir. Bu hücreler hem sitokin salgılayarak hemde virüse özgül B ve CD8+ T hücrelerini aktive ederek yanıt oluşturulmasında farklı yollardan etkili işleve sahiptir. Özellikle iyileşen hastalarda klinik bulguların ortaya çıkışı ve ALT artışları ile aynı zamanda HCV'ye özgül CD4+ T hücrelerinin yoğun artışı, IL-2 ve IFN- γ üretimi dikkat çekicidir. Aksine kronik enfeksiyon gelişenlerde CD4+ T hücre cevabı yok veya çok azdır. Başlangıçta yüksek olan hücre yanıtı tekrar eden viremler ile kayba uğramaktadır (53, 139) .

Akut HCV enfeksiyonunda CD8+ T hücreleri, çoğalabilmelerine rağmen, IFN- γ üretiminde yetersiz kalmaları dolayısı ile sitotoksik aktivite bakımından sersemlemiş

(stunned) durumdadırlar. Bu fenotipin viral bir faktör tarafından mı indüklendiği yoksa olgunlaşmanın bir adımındaki bozukluktan mı kaynaklandığı henüz bilinmemektedir (136).

Enfeksiyonun bu aşamasında antiviral sağaltım CD8+ T hücre yanıtlarında hızlı bir düşüşe sebep olur. Bu da HCV'ye özgül CD8+ T hücrelerinin kısa yaşam ömürlü ve antijen bağımlı efektör hücreler olduğunu desteklemektedir. Öte yandan HCV'ye özgül CD8+ T hücre disfonksiyonu HCV'ye özgül CD4+ T hücre yanıtları gelişir gelişmez düzelir ve HCV RNA titreleri düşer (137).

HCV'ye özgül T hücre yanıtları, periferik kanda ve karaciğerde HCV RNA titreleri ile izlenebilir. Bu izlemlerde IFN- γ indüksiyonunun HCV RNA titrelerindeki azalma ile paralel gittiği bildirilmektedir. İyileşen bireylerde, tanımlanmış 37 HCV epitopundan 10'una karşı immun yanıt olduğu gösterilmesine rağmen kronik enfeksiyonu olanlarda bir epitopdan daha fazlasına karşı özgül yanıt saptanmamıştır (17). Spontan iyileşen HCV ile enfekte bireylerde özgül CD8+ T hücre yanıtları çok sayıda epitopu hedef alan yaygın ve kuvvetli bir nitelik gösterir. Buna karşın kronikleşen enfeksiyonlu bireylerde yanıtlar sıklıkla zayıftır ve sadece bir ya da birkaç epitopu hedef alır (35, 142).

HCV'ye özgül CD4+ T hücre yanıtı yetersizse kronik enfeksiyon gelişmektedir. CD4+ T hücre yanıtının HCV enfeksiyonunun kontrolü için kritik olduğu ve bu yanıt olmaksızın HCV'ye özgül CD8+ T hücrelerinin ve nötralize edici antikörlerin gelişebildiği fakat vireminin kontrolünde başarısız kaldıkları gösterilmiştir (53).

CD8+ T hücreler hem sitotoksik hemde IFN- γ ve TNF α gibi sitokin üretimine aracılık eden etkilere sahiptir. İn vitro çalışmalar IFN α/β kadar IFN- γ 'nında HCV replikasyonunu inhibe edebildiğini göstermektedir (28).

2.2.1.3 Sıvısal bağışık yanıtlar

HCV, enfekte olan hastalarda enfeksiyonu izleyen bir hafta boyunca serumda yüksek titrelere ulaşır. Genellikle enfeksiyondan 7-31 hafta sonra HCV'ye özgü antikörler serumda saptanabilir düzeye çıkar. Sıvısal bağışık yanıt pek çok viral proteine özgü olmakla birlikte antikörlerin büyük bir bölümü E1 ve E2 zarf glikoproteinlerine ait epitoplara yöneliktir.

HCV enfeksiyonu bağıışıklığı baskılanmış hastalarda saptanabilir antikor yanıtı ortaya çıkmaksızın iyileşebilmektedir. Bu tip hastalarda nötralize edici antikorlar geç ortaya çıkar ve izolata özgüdür. İzolata özgül nötralize edici antikor yanıtlarının HCV iyileşmesiyle ne kadar ilişkili olduğu henüz açıklık kazanmamıştır (94). Bununla birlikte kronik HCV enfeksiyonu gelişen durumlarda nötralize edici antikor titreleri artmakta ve birçok HCV genotipine karşı çapraz reaksiyon vermekte fakat virüsleri temizlemekte başarısız olmaktadır (73).

2.3. HCV Tanısı

HCV enfeksiyonu kendine özgü klinik belirtiler göstermediği için tanısında virolojik testler kullanılır.

HCV enfeksiyonun tanısında ve izleminde kullanılan testler, serolojik testler (antikor, antijen testleri), nükleik asit tabanlı (NAT) testler olarak iki ana başlık altında toplanabilir.

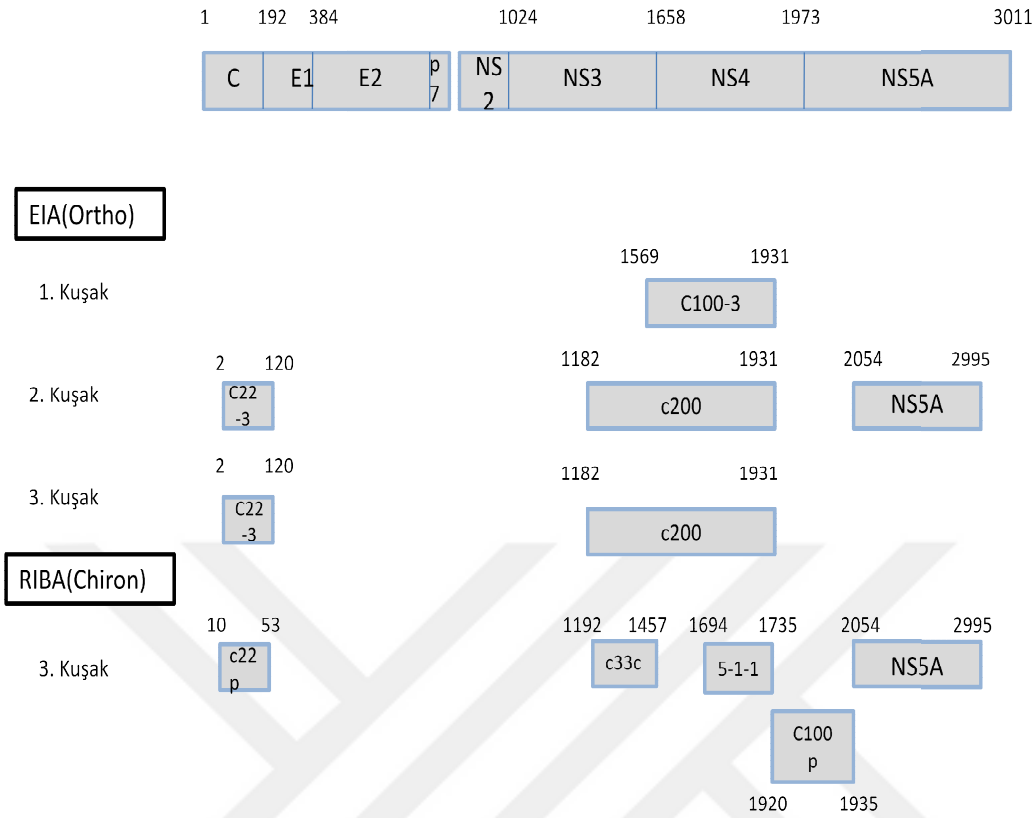
2.3.1. Serolojik Testler

Bu testlerde tanı, HCV'ye ait antijenlerin ve/veya özgül antikorların hasta serumunda saptanmasıyla gerçekleştirilir.

- Antikor Saptanması

Antikor testlerinde amaç HCV'nin çeşitli antijenlerine karşı oluşan antikorların serumda saptanmasıdır. Birinci kuşak olarak tanımlanan HCV EIA'da antijen olarak virusun ilk kez tanımlandığı 5-1-1 klonundan elde edilmiş 363 aa'lık bir peptid olan c100-3 kullanılmıştır. Daha sonraları buna diğer rekombinant HCV antijenleri de eklenerek 2. kuşak HCV EIA sistemleri ticari olarak üretime geçmiştir. Günümüzde kullanılan en yeni sistem ise diğer antijenlere ek olarak NS5B proteini eklenmiş olan 3. kuşak EIA testleridir.

Üçüncü kuşak EIA testlerinin duyarlılığı %95'in üzerindedir. Duyarlılık özellikle kronik HCV'li hastalarda %99'un üzerindeyken, düşük risk gruplarında (kan donörleri gibi) pozitif saptanan anti-HCV EIA testlerinin HCV RNA PCR ve/veya RIBA (recombinant Immunoblot Assay) ile doğrulanması önerilmektedir.



Şekil 6. Antikor saptamada kullanılan farklı kuşak EIA testlerine ait antijenler (149'dan değiştirilerek alınmıştır.)

- Antijen Saptanması

Antijen testleri özellikle “core” antijeninin belirlenmesine yönelik olarak geliştirilmiştir. Üretilen birinci nesil antijen testlerinin yeterince duyarlı olmaması nedeniyle kombine testler geliştirilmiştir. Bu testler hem antijeni hem de antikoru saptayabilmektedir. Yeni geliştirilen testlerin, klasik EIA testlerine göre analitik duyarlılıkları daha yüksektir.

HCV antijen testleri ile serumdaki HCV RNA düzeyinin korele olduğu gösterilmiştir (21).

2.3.2. Nükleik asit Testleri (NAT)

HCV tanı ve izleminde kullanılan nükleik asit tabanlı testler; kalitatif (pozitif/negatif olarak sonuç veren), kantitatif (viral yük bildiren) ve genotiplendirmede kullanılan testler olarak üçe ayrılabilirler.

- **Kalitatif testler**

Bu testler özellikle akut enfeksiyonların tanısı, ve transfüzyon güvenliğinin sağlanması amacıyla kullanılmaktadır.

Reverse transkriptaz-polimeraz zincir tepkimesi (RT-PCR), gerçek zamanlı RT-polimeraz zincir tepkimesi (real time RT-PCR) ve transkripsiyon aracılı çoğaltma (TMA) yöntemlerine dayalı kalitatif testler ticari olarak bulunmaktadır.

- **Kantitatif testler**

Bu testler HCV viral yükünün, sağaltıma yanıtın ve süresinin belirlenmesinde kullanılmaktadırlar.

Gerçek zamanlı RT-polimeraz zincir tepkimesi (real time RT-PCR), transkripsiyon aracılı çoğaltma (TMA) ve sinyal amplifikasyon yöntemi olan dallı zincirli DNA (bDNA Assay) yöntemlerine dayalı kantitatif testler bulunmaktadır. . Testler arasında yöntemle bağlı olarak analitik duyarlılık ve kantitasyon aralığı bakımından farklar bulunmaktadır. Günümüzde gerçek zamanlı RT-PCR yöntemine dayalı testler, sağladığı yüksek duyarlılık ve geniş kantitasyon aralığı nedeniyle tercih edilmektedir.

- **Genotipleme Testleri**

HCV'nin bugüne dek tanımlanmış 7 genotipinin klasik sağaltım yanıtları birbirinden farklıdır. Genotip 1 ve 4 interferona daha dirençliyen, tip 2 ve 3 sağaltıma daha iyi yanıt vermektedir. Bu nedenle genotipin belirlenmesi, epidemiyolojik amaçların yanı sıra sağaltım süresini ve ilaç dozunu belirlemek için gereklidir. Proteaz inhibitörleri ile tedavinin düzenlenmesinde de genotip 1'in varlığı ve alttiplerin belirlenmesi önemlidir.

HCV genotiplerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında; DNA dizi analizi, genotipe özgül oligonükleotid problarla ters hibridizasyon, restriksiyon enzim analizi (REA), genotipe özgül primerler ve probları kullanan real-time RT-PCR yöntemleri sayılabilir.

Genotiplendirme testlerinin temel prensibi, farklı tiplerin genomları arasındaki nükleik asit değişikliklerini saptamaktır. En ideal yöntem tüm genomu dizilemek olsa

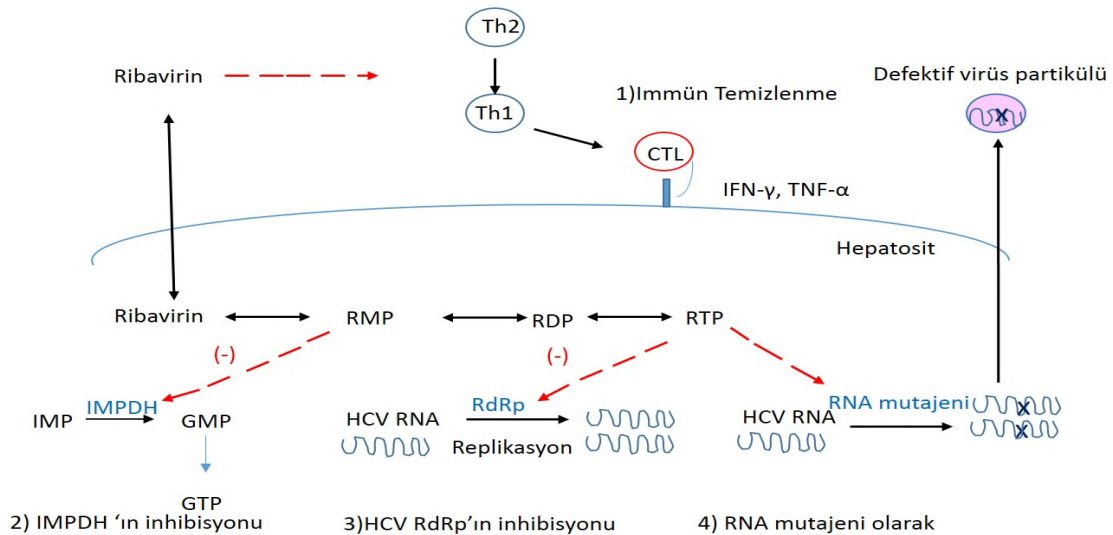
da pratikte kullanımının zorluğu nedeniyle, genomu temsilen 5'UTR, NS5B ve "core" bölgeleri kullanılmaktadır.

2.4. Sağaltım

2.4.1. Peg-IFN ve Ribavirin Sağaltımı

Kronik HCV enfeksiyonu için klasik sağaltım, pegillenmiş (polietilen glikol eklenmiş) interferon ve ribavirin kombinasyonunun 12 ve 48 hafta süreyle kullanılmasıdır. Interferonlar (IFN), 1957 yılında, virus ile enfekte olmuş hücreden salgılan ve komşu hücrelerin enfekte olmasını engelleyici bir faktör olarak tanımlanmıştır. İnsanda üç farklı tip IFN bulunur. Bunlar IFN I olarak tanımlanan IFN- α , β ve ω ; IFN II olarak tanımlanan IFN- γ ve IFN III olarak tanımlanan IFN- λ 'dır. IFN'un hücresel bir reseptöre bağlanması interferon aracılı (ISGs) genlerin ekspres olmasını sağlar. IFN hem antiviral hem de hücre içi yollar üzerine etkileri aracılığıyla (Şekil 5) immun sistemi uyarıcı (naturel killer hücre aktivasyonu, DC olgunlaşması, hafıza T hücrelerinin gelişimi, T hücre apoptozunun önlenmesi) özelliklere sahiptir. Polietilen glikol eklenmiş interferonun serumda yarılanma süresi daha uzun ve hücreler tarafından emilimi daha yüksektir (22).

Ribavirin bir nükleosid analogudur. Tam etki mekanizması bilinmemekle birlikte ileri sürülen mekanizmalar Şekil 6'da sunulmuştur (64).



Şekil 7. Ribavirin etki mekanizmaları 1-Immünomodülasyon 2-IMPDH (inosine-monophosphate-dehydrogenase) enzim inhibisyonu 3-Replikasyonunun direk inhibisyonu 4-Defektif virionlara yol açacak mutasyonlar (22'den değiştirilerek alınmıştır.)

Ribavirinin tek başına kullanılması virüsü tamamen ortadan kaldıramamaktadır ancak IFN ile kombine uygulandığında daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Sağaltım başarısı kalıcı virolojik yanıt (KVY) ile ölçülür. KVY, HCV RNA kaybı veya sağaltım bitiminden sonra en az 6 ay devam eden HCV RNA yokluğu olarak tanımlanır.

Peg-IFN ve ribavirinden oluşan standart sağaltım ile genotip 2 ve 3'de %80, genotip 1'de %40-50 civarında başarı oranı vardır (146). Yan etkiler ve özellikle genotip 1 ile 4'deki başarı yüzdelerinin düşük olması yeni nesil antivirallere ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Tablo 3. Sağaltım Sonunda ve Sonrasında Cevap Kriterleri (132)

Sağaltım Sonunda ve Sağaltım Sonrası Yanıt Kriterleri	
Sağaltım sonunda yanıt	HCV RNA sağaltım sonunda saptanamaz
Kalıcı viral yanıt (KVY)	HCV RNA sağaltım bittikten 24 hafta sonra da saptanamaz
Tekrar	HCV RNA saptanamaz hale geldikten sonra tekrar saptanır

Tablo 4. Sağaltım Sırasında Yanıt Kriterleri (132)

Sağaltım Sırasında Yanıt Kriterleri ve Olası Sonuçları			
Hızlı viral yanıt (HVY)	4. haftada HCV RNA saptanamaz	Daha kısa süreli sağaltım uygulanabilir.	
Erken viral yanıt (EVY)	12. haftada HCV RNA'da ≥ 2 -log düşüş	Eğer EVY gerçekleşmezse sağaltım sonlandırılabilir çünkü olasılıkla KVY gelişmez.	
Tamamlanmış erken viral yanıt	12. haftada HCV RNA saptanamaz		
Kısmi erken viral yanıt	12. haftada HCV RNA 2-log düşer ancak hala saptanabilir	Sağaltım sonlandırılabilir çünkü olasılıkla KVY gelişmez	
İlerleme	HCV RNA sağaltım sırasında ≥ 1 -log yükselir	Eğer gerçekleşirse sağaltım sonlandırılabilir çünkü	

		olasılıkla KVV gelişmez
Yanıtsız	HCV RNA 12. haftada ≤ 2 -log düşüş gösterir ya da sağaltım saptanamaz hale geçmez	Sağaltım çünkü olasılıkla KVV gelişmez
Tamamıyla yanıtsız	HCV RNA 12. haftada < 1 -log düşer	Yeni ajanlarla bile viral temizlenme şansının düşük olduğu öngörülmektedir

2.4.2. Doğrudan Etkili Antiviraller

Klasik sağaltım yöntemi olan Peg-IFN ve ribavirin sağaltımı konak immün yanıtları stimüle ederek etki göstermektedir. Yan etkilerin fazla olması hastaların çoğunun sağaltımı yarıda kesmelerine neden olmaktadır. Daha da önemlisi tüm dünyada yaygın genotip 1 ile enfekte olan hastaların yarısından azı sağaltıma yanıt vermektedir (75, 91, 144). Bu sebeplerle son yıllarda HCV'nin yaşam döngüsüne doğrudan etkili olan antiviraller (DEA) kullanıma girmiştir. DEA'lar, HCV yaşam döngüsü üzerinde yoğunlaşmış çalışmalardan ve bu döngüde kritik öneme sahip proteinlerin yapılarının aydınlatılmasından sonra geliştirilen ve doğrudan virus üzerine etki eden yeni nesil ilaçlardır. *In vitro* testler sonucunda pek çok ümit vaadeden ilaç tanımlanmıştır, bazıları sağaltım amaçlı kullanılmaya başlanmış durumda, bazıları ise klinik testleri devam etmektedir (90). Antiviral stratejilerinin odağında şu an iki büyük molekül ailesi bulunmaktadır: NS3/4a proteaz inhibitörleri ve NS5B RNA bağımlı RNA polimeraz inhibitörleri (90,114, 124).

2.4.2.1 Proteaz inhibitörleri ve direnç

HCV poliprotein translasyon sonrası işlenmesi konak peptidazlarıyla ve viral proteazla ilişkilidir. NS3/4A serin proteaz, NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A ve NS5A/NS5B bölgelerinin kesilmesinden sorumludur (7). Doğrudan etkili antivirallerin ilk kuşağını Nisan 2011'de Avrupa ve ABD'de sağaltımda kullanılması onaylanan Telaprevir ve Boceprevir oluşturmaktadır. Bu ilaçlar NS3/4A serin proteazın aktif bölgesiyle geçici kovalent bağlar kurarak inhibe eden lineer ketoamid inhibitörleridir. Kullanılmaya başlanmalarından itibaren HCV ile enfekte olan hastaların kalıcı viral yanıt oluşturma oranları klasik ikili sağaltımdakine oranla kaydadeğer ölçüde artmıştır (100).

Kullanılmakta olan proteaz inhibitörlerinin etkisi enzim ile birkaç noktada yapılan sıkı bağlantı ile gerçekleşebilmektedir. Bu yüzden enzim kodlayan bölgede gerçekleşen az sayıdaki mutasyon bile ilacın inhibitör aktivitesini kaybetmesiyle sonuçlanabilmektedir (6, 36, 56, 85). NS3 proteazın farklı pozisyonlarında gerçekleşen mutasyonlar proteaz inhibitörlerine olan duyarlılığın yitilmesiyle sonuçlanabilir. Birinci kuşak proteaz inhibitörlerine (Telaprevir, Boceprevir) direnç genellikle 36, 54, 55, 80, 155, 156, 168 ve 170. pozisyonlardaki mutasyonlarla karakterizedir. Direnç mutasyonu profili HCV genotipi ve subtipinden etkilenmektedir. Mutasyon profilinin genotip ve subtipten etkilenmesinin nedeni, aynı pozisyonda farklı genotip ve subtiplerde aminoasit değişimi için kodonda değişmesi gereken nükleotit sayısı ile ilişkili olabilir. Bu durum genotip 1b ile enfekte hastaları dirençli varyant oluşumu bakımından genotip 1a ile enfekte olan hastalara göre daha dirençli kılmaktadır (6, 36, 55, 56, 98, 99, 113, 139).

Lineer Pİ'ler öncelikli olarak genotip 1 enfeksiyonunun sağaltımı amacıyla tasarlanmışlardır ve diğer genotipler üzerinde kısıtlı etkili ya da etkisiz ilaçlardır. Telaprevir tek başına ya da PEG IFN+RBV ile birlikte genotip 2 ile enfekte hastalarda HCV RNA'yı düşürmüştür ancak genotip 3 için böyle bir etkisi yoktur (116).

Erken *in vitro* çalışmalar göstermektedir ki 156S mutanı Telaprevire karşı oluşan dirençte en önemli değişimdir (70). Faz I klinik çalışmalarında bu mutantın dışında farklı direnç mutantları da bulunmuştur. Düşük düzey dirence neden olanların (36A/M, 54A, 155K/T ve 156S) daha yüksek seviyede dirence neden olanlardan (156V/T, 36+155, 36+156) daha iyi viral fitnessa sahip oldukları gösterilmiştir (112). Genotip 1a için en yaygın varyantlar V36M ve R155K iken, genotip 1b de genellikle gözlenen direnç varyantları V36A, T54A, A156S/T'dir. Boceprevir ve Telaprevir arasında kaydadeğer ölçüde çapraz direnç mevcuttur. T54A, V170A ve A156S/T dirençli varyantlar *in vitro* olarak gözlenmiştir (133). Buna ek olarak, V36M/A/G, Q41R, T54S, V55A, R155K/T/L direnç mutasyonları da *in vivo* olarak gözlenmiştir (127, 139). V36G, T54S, R155L mutasyonlarının düşük düzey dirence neden oldukları, T54A, V55A, R155K, A156S, ve V170A mutasyonlarının orta düzey dirence neden oldukları belirlenmiştir. A156T ise Boceprevir'e karşı yüksek düzey dirençli varyant olarak bilinmektedir (127). 43S, 117H ve 174F Telaprevir için, 41R,

43S/V, 168N/Y ve 170T Boceprevir için muhtemel drençli olarak tanımlanmıştır (61, 66, 128, 134).

Asunaprevir bir başka lineer proteaz inhibitörüdür. *In vitro* yapılan çalışmalarda genotip 1a ve 1b dışında 4a üzerine de etkili olduğu ve 168A/C/E/G/H/V/Y değişimlerinin dirence neden olabileceği gösterilmiştir (79).

Birinci kuşak proteaz inhibitörlerinin ardından 2013'de simeprevir FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından genotip 1 ile enfekte hastaların tedasi için onaylanmıştır. Proteaz inhibitörlerinin ikinci kuşağını temsil etmektedir. İkinci kuşak Pİ'ler iyileştirilmiş etki ve doz ayarlamasına karşın birinci kuşak Pİ'ler ile benzer direnç profilini taşımaktadırlar (66). Hem birinci hem ikinci kuşak Pİ'ler, düşük direnç bariyeri ve ilaçlar arasında çapraz direnç ile karakterizedir.

In vivo çalışmalarda Simeprevir'e karşı oluşan dirençte üç temel aminoasid bölgesinde (Q80, R155, D168) mutasyon tespit edilmiştir. Bunun yanında, *in vitro* çalışmalarda da F43 ve A156 pozisyonlarında da direnç gelişebildiği gösterilmiştir (66, 106). Q80 pozisyonunda oluşan mutasyon düşük dirence, R155 ve F43 pozisyonlarında oluşan mutasyonlar orta düzey dirence ve D168 pozisyonunda oluşan mutasyon yüksek seviyede dirence neden olmaktadır. A156 pozisyonunda gerçekleşen mutasyon aa değişimine göre değişim göstermektedir. A156V değişimi yüksek düzey dirence neden olurken A156G/T değişimleri orta düzey dirence neden olmaktadır (66).

Daha önceden ABT-450 olarak bilinen paritaprevir, ritonavir, NS5A protein inhibitörü olan ombitasvir ile kombine olarak RBV ile birlikte veya onsuz olarak genotip 1 enfeksiyonlarının sağıaltımında kullanılmaktadır (58).

Grazoprevir bir diğer ikinci kuşak proteaz inhibitörüdür. Günde tek tablet kullanımı ve geniş genotip etki aralığı (1a/b, 4a, 6a, 5a, 2a/b, 3a) yönünden oldukça etkili bir ilaçtır. Diğer Pİ'lerine karşı gelişmiş dirençli mutasyonlardan, T54A/S,'yı barındıran virüslere karşı da etkilidir (42). Genotip 1 için 168. pozisyondaki herhangi bir mutasyon dirence neden olmaktadır. Dokuz farklı Pİ'nin (telaprevir, boceprevir, simeprevir, asunaprevir, vaniprevir, faldaprevir, paritaprevir, deldeprevir, ve grazoprevir) yer aldığı *in vitro* çalışmada en etkili ilacın grazoprevir olduğu

bulunmuştur (47). Gelecekte grazoprevirin genotip 1 ve 4 enfeksiyonlarının sağaltımında IFN'suz olarak kullanılması beklenmektedir (4).

2.4.2.2 Polimeraz inhibitörleri ve diğer DEA'lar

HCV nükleozit analogu polimeraz inhibitörleri ailesi, fizyolojik nükleotit trifosfatlarla yarışarak enzimin katalitik bölgesine bağlanarak inhibisyonu gerçekleştirir (100). Nükleozitler aynı zamanda zincir sonlandırıcıları olarak da bilinirler çünkü bir sonraki nükleotit trifosfatın RNA zincirine bağlanmasını engellerler. Nükleozit analogları diğer ilaçlardan farklı olarak yüksek direnç bariyerine sahiptir ve tüm genotipler üzerinde etki gösterirler. Pek çok nükleozit analogu umut vaadeden sonuçlar vermiştir. Sofosbuvir bunların içinden ilk onaylanıdır (33, 97, 125).

Sofosbuvirin farklı HCV genotipleri üzerindeki etkisi in vitro replikon sistemleri kullanılarak test edilmiştir. Örneğin, genotip 1a,1b, 2a (strain JFH-1) replikonu,2a,2b ve 3a chimeric replikonları üzerinde etkilidir. S282T mutasyonu in vitro çalışmalarda tüm genotiplerde seçilmiş olan tek direnç mutasyonudur. S282T mutasyonu düşük-orta seviye direnç göstermektedir. Bu varyantların replikasyon kapasitesi yabancı olanla kıyaslandığında oldukça düşüktür (102).

Mericitabine, sitozin nükleozit analoglarının öncül ilacıdır.Tüm genotiplere karşı etkilidir. Ancak daha çok genotip 1'e karşı çalışmaları yürütülmektedir. S282T mutasyonu sonucu virusun mericitabine'e karşı duyarlılığı azalsa da yabancı türle karşılaştırıldığında replikasyon kapasitesinde %15 düşüş olduğu saptanmıştır (1, 92).

Diğer doğrudan etkili antivirallerin aksine nükleozit analogları tüm genotiplerde etkilidirler. Bu özellikleri yüksek direnç bariyerine sahip olmaları ve primer direncin bu ilaç grubunda var olmamasıyla birleştiğinde geleceğin interferonsuz sağaltım uygulamalarında bu ilaçların kilit rol alacağı söylenebilir. Ancak klinik araştırmalarda genotip 2'ye kıyasla genotip 3'de KVVY oluşturmada daha düşük frekansa sahip oldukları gösterilmiştir (96).

Tablo 5. Proteaz İnhibitörlerine karşı oluşan dirençli varyantlar

İlişkili Proteaz İnhibitörü	Nükleotit Değişimi	Genotip	Direnç Durumu	Referans
Telaprevir	36A	1	dirençli	Zhou ve ark. 2008; Kieffer ve ark. 2012; Kieffer ve ark. 2012
Telaprevir	36G	1	dirençli	Zhou ve ark. 2008; Kieffer ve ark. 2012
Telaprevir	36L	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010; Zhou ve ark. 2008; Kieffer ve ark. 2012
Telaprevir	36M	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Sarrazin ve ark. 2007; Tong ve ark. 2008; Zhou ve ark. 2008; Kieffer ve ark. 2012; Kieffer ve ark. 2012; Lagacé ve ark. 2012
Telaprevir	43S	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010; Tong ve ark. 2008; Lagacé ve ark. 2012
Telaprevir	54A	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010; Sarrazin ve ark. 2007; Tong ve ark. 2008; Zhou ve ark. 2008; He ve ark. 2008; Kieffer ve ark. 2012; Lagacé ve ark. 2012
Telaprevir	54S	1	Muhtemel dirençli	Süsser 2009; Bae ve ark. 2010; Kieffer ve ark. 2012
Telaprevir	55A	1	Muhtemel dirençli	Süsser 2009
Telaprevir	117H	1	Muhtemel dirençli	Susser S, Schelhorn S, Lange C, ve ark. Ultratiefe Pyrosequenz-Analyse (UDPS) von neu beschriebenen seltenen Resistenzvarianten der Hepatitis C Virus NS3 Protease bei Patienten, die mit Telaprevir oder Boceprevir behandelt wurden. Z Gastroenterol 2012; 50.
Telaprevir	155G	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Kieffer ve ark. 2012
Telaprevir	155K	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Tong ve ark. 2008; He ve ark. 2008; Kieffer ve ark. 2012; Lagacé ve ark. 2012
Telaprevir	155M	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Kieffer ve ark. 2012
Telaprevir	155Q	1	dirençli	He ve ark. 2008; Lenz ve ark. 2010
Telaprevir	155T	1	dirençli	Sarrazin ve ark. 2007; Lenz ve ark. 2010; Kieffer ve ark. 2012
Telaprevir	156F	1	dirençli	Kieffer ve ark. 2012
Telaprevir	156N	1	dirençli	Kieffer ve ark. 2012
Telaprevir	156S	1	dirençli	Lin ve ark. 2004; Sarrazin ve ark. 2007; Tong ve ark. 2008; Süsser 2009; He ve ark. 2008; Lenz ve ark. 2010; Kieffer ve ark. 2012; Kieffer ve ark. 2012
Telaprevir	156T	1	dirençli	Lin ve ark. 2005; Tong ve ark. 2008; He ve ark. 2008; Lenz ve ark. 2010; Kieffer ve ark. 2012
Telaprevir	156V	1	dirençli	Lin ve ark. 2005; He ve ark. 2008; Lenz ve ark. 2010; Kieffer ve ark. 2012

Telaprevir	170A	1	Muhtemel dirençli	Tong ve ark. 2008; Süsser 2009; He ve ark. 2008
Telaprevir	174F	1	Muhtemel dirençli	Susser S, Schelhorn S, Lange C, ve ark. Ultratiefe Pyrosequenz-Analyse (UDPS) von neu beschriebenen seltenen Resistenzvarianten der Hepatitis C Virus NS3 Protease bei Patienten, die mit Telaprevir oder Boceprevir behandelt wurden. Z Gastroenterol 2012; 50.
Boceprevir	36A	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	36G	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	36L	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	36M	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Tong ve ark. 2008; Zhou ve ark. 2008; Lagacé ve ark. 2012
Boceprevir	41R	1	Muhtemel dirençli	Tong ve ark. 2008; Lagacé ve ark. 2012
Boceprevir	43S	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010; Tong ve ark. 2008; Lagacé ve ark. 2012
Boceprevir	43V	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010; Lagacé ve ark. 2012
Boceprevir	54A	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010; Tong ve ark. 2008; Lagacé ve ark. 2012
Boceprevir	54C	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Tong ve ark. 2008; Lagacé ve ark. 2012
Boceprevir	54G	1	dirençli	Wyles 2012; http://www.idsociety.org/uploadedFiles/IDSA/Hepatitis_C/For_IDSA_Members/ForumforCollaborativeHIV-ClinicallyRelevantHCVDrug.pdf
Boceprevir	54S	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Süsser 2009; Bae ve ark. 2010
Boceprevir	55A	1	dirençli	Wyles 2012; http://www.idsociety.org/uploadedFiles/IDSA/Hepatitis_C/For_IDSA_Members/ForumforCollaborativeHIV-ClinicallyRelevantHCVDrug.pdf
Boceprevir	155G	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	155I	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	155K	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Tong ve ark. 2008; Lagacé ve ark. 2012
Boceprevir	155M	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	155T	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	156G	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	156S	1	dirençli	Tong ve ark. 2008; Süsser 2009; Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	156T	1	dirençli	Tong ve ark. 2008; Lenz ve ark. 2010; Lagacé ve ark. 2012

Boceprevir	156V	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	168N	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	168Y	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	170A	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Tong ve ark. 2008; Süsser 2009
Boceprevir	170T	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010
Boceprevir	174F	1	dirençli	Susser S, Schelhorn S, Lange C, ve ark. Ultratiefe Pyrosequenz-Analyse (UDPS) von neu beschriebenen seltenen Resistenzvarianten der Hepatitis C Virus NS3 Protease bei Patienten, die mit Telaprevir oder Boceprevir behandelt wurden. Z Gastroenterol 2012; 50.
Simeprevir	36A	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	36L	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010; Lenz ve ark. 2013
Simeprevir	36M	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	43I	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	43S	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Lagacé ve ark. 2012
Simeprevir	43V	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Lagacé ve ark. 2012
Simeprevir	80H	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	80K	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Bae ve ark. 2010; Lenz ve ark. 2013
Simeprevir	80R	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010; Lagacé ve ark. 2012
Simeprevir	122R	1	dirençli	Lenz ve ark. 2013
Simeprevir	138T	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	155G	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	155K	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Lagacé ve ark. 2012
Simeprevir	155Q	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Lagacé ve ark. 2012
Simeprevir	155T	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	156G	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	156T	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Lagacé ve ark. 2012
Simeprevir	156V	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	168A	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Lagacé ve ark. 2012
Simeprevir	168E	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Lenz ve ark. 2013
Simeprevir	168G	1	Muhtemel dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	168H	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	168I	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	168N	1	Muhtemel	Lenz ve ark. 2010

			dirençli	
Simeprevir	168Q	1	dirençli	Lenz ve ark. 2013
Simeprevir	168T	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	168V	1,4	dirençli	Lenz ve ark. 2010; Lagacé ve ark. 2012
Simeprevir	168Y	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Simeprevir	170T	1	dirençli	Lenz ve ark. 2010
Asunaprevir	36A	1b	Muhtemel dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	36L	1b	Muhtemel dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	36M	1b	Muhtemel dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	41R ve 80R	1b	Muhtemel dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	80K	1b	Muhtemel dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	155K	1b	dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	156S	1b	Muhtemel dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	156T	1b	Muhtemel dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	156V	1b	Muhtemel dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	168A	1b	dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	168C	1b	dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	168E	1b	dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	168G	1b	dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	168H	1b	dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	168V	1b	dirençli	McPhee ve ark. 2012
Asunaprevir	168Y	1b	dirençli	McPhee ve ark. 2012
Grazoprevir	36A	1b	Muhtemel dirençli	Howe ve ark. 2014
Grazoprevir	36L	1b	Muhtemel dirençli	Howe ve ark. 2014
Grazoprevir	36M	1b	Muhtemel dirençli	Howe ve ark. 2014
Grazoprevir	155G	1b	dirençli	Howe ve ark. 2014
Grazoprevir	156T	1b	dirençli	Howe ve ark. 2014
Grazoprevir	168A	1b	dirençli	Howe ve ark. 2014
Grazoprevir	168E	1b	Muhtemel dirençli	Howe ve ark. 2014
Grazoprevir	168G	1b	dirençli	Howe ve ark. 2014
Grazoprevir	168K	1b	dirençli	Howe ve ark. 2014
Grazoprevir	168herhangi	1	dirençli	Jensen ve ark. 2015
Paritaprevir	168V	1b	dirençli	Chayama ve ark. 2015
Paritaprevir	168E	1b	Muhtemel dirençli	Pilot-Matias ve ark. 2015
Paritaprevir	168E	1b, 5a	Muhtemel dirençli	Jensen ve ark. 2015

2.5 HCV NS3 Proteininin Epitopları ve Patogenezdeki Olası Rollerini

631 aa'lık HCV NS3 proteini beş bölgeden (domain) oluşmaktadır. Amino ucundaki iki bölge (ilk 180 aa) NS4A kofaktörü ile birlikte serin proteazı, karboksii ucundaki üç bölge ise helikaz'ı oluşturur. Proteaz kısmı helikaz kısmına göre daha hidrofobiktir. Bu proteinin her ikisinin de işlevsel olması diğerinin etkinliği için gereklidir. NS3 proteininin elektrostatik analizleri proteaz ve helikazın domain 2'si arasında pozitif yüklü bir yarık bulunduğunu göstermiştir. Bu yarıkdaki aa'ler RNA'nın negatif yüklü omurgasına proteini bağlayabilmektedir (29).

HCV poliprotein işlemlenmesinin ve replikasyonunun yanı sıra, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) genlerinin aktivasyonuna ve dsDNA kırıklarına sebep olan reaktif oksijen türlerinin üretimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (76).

NS3'ün "transforming growth factor- α /Smad3" aracılı apoptozu bloke ettiği, INF- β indüksiyonunu baskıladığı ve böylece dirençli HCV enfeksiyonunun oluşumuna yardım ettiği ayrıca tümör baskılayıcı p53'ün fonksiyonunu inhibe ettiğide bildirilmiştir. Bu yüzden NS3 proteininin HCV'nin çoğalması ve onkogeneizde önemli bir rolü olduğu görülmektedir (9, 12, 20).

HCV NS3 proteini işlemlenme ve replikasyondaki fonksiyonlarından dolayı proteaz inhibitörlerinin ilk hedefi haline gelmiştir. Klasik sağaltım ile sağaltılan hastalardan izole edilen HCV'ye özgül sitotoksik T lenfositlerin NS3 bölgesindeki epitopları tanıdığı gösterilmiştir (16, 49).

HCV RNA genomu replikasyon sırasında mutasyonlara uğramaktadır. Fakat bazı epitoplar çok az mutasyon geçirmektedirler. Bunun en iyi örneklerinden biri NS3 proteazın 1073 -1081 residülerine denk gelen epitopu çok az değişkenliğe sahip ve immunodominant HLA-A2 sınırlı bir CTL epitopudur. Bu korunmuşluk HCV NS3 proteinin proteaz ve NTPaz/helikaz aktivitesi için önemlidir ve enzim bölgelerindeki mutasyonlar virüs için ölümcül olabilir (118).

Gerlach JT ve arkadaşları geçici veya kalıcı viral kontrolü sağlayan hastalarda NS3'e ait immunodominant ve yüksek derecede korunmuş olan bir dizi CD4+ T hücre epitopunu tanımlamışlardır (34). HCV enfeksiyonundan iyileşmiş 22 kişiyile tüm HCV NS proteinleri ile yapılan bir çalışmada CD4+ T hücreler tarafından en sıklıkla tanınan 6 peptidin 3'ü (PAAYAAQGYKVLVLNPSVAA-aa1241 -1260,

TPAETTVRLRAYMNTPLPV- aa1531–1550, ENLPYLVAYQATVCARAQAP- aa 1581–1600) HCV NS3 bölgesindedir. İyileşenlerin %50'sinden daha fazlasında en sık tespit edilen 2 tanesi NS3 (aa1241 -1260) ve NS4 (aa1771 -1790)'e aittir. Bu kişilerin %30'undan fazlası tarafından tanınan peptitlerin 4'ünden 2'si (aa1531–1550), (aa 1581–1600) NS3 proteinine aittir (117).

HCV NS3 proteini enzim işlevi nedeniyle, genomun diğer bölgelerine görece sınırlı mutasyon aralığına sahiptir. Epitoplardaki bu sınırlı değişim immün sistemden kaçışını zorlaştırmaktadır. NS3 proteininin HCV g1 için, insanda deneysel olarak onaylanmış CLT hücre epitoplari Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6. HCV g1 için NS3 proteinin insana ait bilinen CD8⁺ T- hücre epitoplari (103)

Peptit	HLA	Protein	Protein Pozisyonu
CTCGSSDLY	A1	NS3	97_105
KLSGLGINAV	A1	NS3	380_389
ATDALMTGYT	A1	NS3	410_419
AATLGFGAYMSKAHG	A11	NS3	233_247
TLGFGAYMSK	A11	NS3	235_244
GAYMSKAHGV	A11	NS3	239_248
TLTHPVTK	A11	NS3	610_617
GLLGCIITSLTGRDKNQVDGEVQVLSTATQSFLATCVNGVCWTVY	A2	NS3	12_56
LLGCIITSL	A2	NS3	13_21
QTFLATCINGVCWTV	A2	NS3	41_55
ATCINGVCWTVYHGA	A2	NS3	45_59
CINGVCWTV	A2	NS3	47_55
YLVTRHADV	A2	NS3	105_113
LLCPAGHAV	A2	NS3	143_151
HAVGIFRAA	A2	NS3	149_157
GYKVLVLNPSVAAT	A2	NS3	222_235
GVDPNIRTGV	A2	NS3	247_256
TITGAPVTYSTYGK	A2	NS3	258_272
TGSPITYSTY	A2	NS3	261_270
DELAACLVALGINAV	A2	NS3	375_389
LAACLVALGINAVAY	A2	NS3	377_391
AKLVALGINAVAYYR	A2	NS3	379_393
KLVALGINAV	A2	NS3	380_389
GLNAVAYYR	A2	NS3	385_393
GFTGDFDSV	A2	NS3	417_425
SVIDCNTCV	A2	NS3	424_432
YLVAYQATV	A2	NS3	559_567

QMWKCLIRL	A2	NS3	580_588
TAYSQQTRGLLG	A24	NS3	4_15
AYSQQTRGL	A24	NS3	5_13
VYHGAGNKTL	A24	NS3	55_64
MYTNVDQDL	A24	NS3	74_82
ITYSTYGKF	A24	NS3	265_273
TYSTYGKFL	A24	NS3	266_274
FYGKAIPIEI	A24	NS3	349_359
GYTGDFDSVI	A24	NS3	417_426
EFWEAVFTGL	A24	NS3	530_539
CINGVCWTV	A3	NS3	47_55
TVYHGAGTK	A3	NS3	54_62
HLHAPTGS GK	A3	NS3	201_210
ATLGFGAYMSKA	A3	NS3	234_245
LGFGAYMSK	A3	NS3	236_244
LIFCHSKKK	A3	NS3	365_373
ALGINAVAY	A3	NS3	383_391
VTLTHPITK	A3	NS3	609_617
HAVGIFRAAV	A68	NS3	149_158
RLGAVQNEV	B13	NS3	601_609
YMSKAYGTDP	B35	NS3	241_250
YGTDPNIRTG	B35	NS3	246_255
YSTYGKFLAD	B35	NS3	267_276
STDATSILGI	B35	NS3	294_303
HPNIEEVAL	B35	NS3	333_341
YGKAIPLEVI	B35	NS3	350_359
RPSGMFDSVVL	B35	NS3	481_491
TPAETTVRL	B35	NS3	505_513
NQVEGEVQI	B38	NS3	27_35
VDFVPVESM	B40	NS3	167_175
IPFYGKA IPL	B51	NS3	347_356
RAQAPPPSW	B58	NS3	570_578
WPAPSGARSL	B7	NS3	85_94
LSPRPVSYLK	B7	NS3	127_136
HPNIEEVALS	B7	NS3	333_342
ELA AKLVAL	B8	NS3	376_384
LIRLKPTL	B8	NS3	585_592
EVTLTHPITKYIMTCMSA	B8	NS3	608_625
TLTHPITK	B8	NS3	610_617
HPITKYIMACMSADL	B8	NS3	613_627

2.6 HCV'nin Türümsü Doğası ve Ekstrahepatik Tutulumları

Türümsü “quasispecies” teorisine göre RNA virus populasyonu konak hücrede birbirinin aynısı genomlar olarak değil, birbirine çok benzeyen ancak az sayıda nükleotit farklılıkları içeren bir mutant spektrumu olarak bulunurlar. Böylelikle enfeksiyon sırasında virüsün konak immün sisteminden kaçması kolaylaşmaktadır (25). Yapılan çalışmalar, viral enfeksiyonlardan korunmada ve iyileşmede önemli rol alan nötralize edici antikörlerin, türümsüler üzerinde etkili olmadığını göstermiştir. Aynı zamanda virüsün kalıcı enfeksiyon oluşturmada da türümsülerin etkili olduğu düşünülmektedir (24,121). HCV'nin kronikleşmesinde etkili olduğu düşünülen mekanizmalardan bir diğeri de, türümsü oluşumu sırasında meydana gelen mutasyonların peptid işlenmesini etkilediği ve bu sayede virüsün CD8⁺ ve CD4⁺ T hücre lenfositleri tarafından tanınmasının engellenmesidir (135, 143). Bazı çalışmalar türümsü çeşitliliğinin kronik enfeksiyonun seyrini de etkilediğini göstermiştir (126,141).

HCV karaciğer hücrelerine yönelim gösteren bir virüs olmasına karşın, viral RNA'nın, periferik mononükleer kan hücrelerinde (PBMC), perihepatik lenf nodlarında veya merkezi sinir sistemi hücrelerinde bulunabildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (63, 82, 86, 101, 104, 105, 142). Ancak bu bölgelerde HCV'nin replikasyon ara ürünü olan negatif yönelimli RNA ipliğinin bulunması karaciğer dışı hücrelerde bulunan virüsün çoğalabilme yeteneğinin tam olmadığını düşündürmektedir (105). Buna karşın HIV ile ko-infekte ya da karaciğer nakli almış bağışıklık sistemi zayıf bireylerde replikasyonun bu bölgelerde de gerçekleşebileceği düşünülmektedir. HCV'nin türümsü çalışmaları da virüsün karaciğer dışı hücrelerde çoğalabildiğini kanıtlamaktadır (25).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan çalışma, girişimsel olmayan deneysel nitelikte bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, 2012-2015 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

2005-2012 yılları arasında karaciğer nakli nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde izlenen hastaların nakil öncesi ve sonrasına ait serum örnekleri DEÜ Hastanesi Merkez Laboratuvarı'ndan elde edilmiştir.

3.4. Çalışma Materyali

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde karaciğer nakli yapılmış hastaların nakil öncesi ve sonrasındaki rutin testler için alınmış toplam 14 serum örneği kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Yöntemlerin anlatıldığı kısımda, her yöntem için değişkenler belirtilmiştir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1 Kullanılan sarf malzemeleri ve cihazlar

- Çözeltilerin hazırlanmasında 18.2MΩH₂O kullanıldı.
- Otoklavlama işlemi 121°C 1 Atm basınç altında 15 dk yapıldı.

0,5M Na₂EDTA (Ethylenediamine tetraacetate) stok solüsyonu

Na₂EDTA(Sigma E5134) 18,6g

Distile su ile 80 mL'ye tamamlandı.

pH'ı ayarlamak için 100 mM'lık NaOH kullanıldı.

100 mL'ye tamamlanıp otoklavlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

50x Tris Asetik EDTA-1000mL

Tris (Sigma T8524)	0,2M(242 gr)
0,5M Na ₂ EDTA, pH 8,0	100mL
Asetik asit (Merck 1000056)	57,1 mL

Distile su ile son hacim 1000 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Jel görüntüleme cihazı: VILBER LOURMAT 0519563

Santrifüj cihazı: Heraeus Labofuge 400R

Yatay jel elektroforez cihazı: Thermo Owl EasyCast Mini Gel System

Isı Döngü Cihazı: Techne TC-412

Kullanılan hazır ticari sarf malzemeleri

Taq Polimeraz (5u/μL)	(Roche #11732 650 001)
Ribonükleaz inhibitörü (20-50u/μL)	(Roche # 03335 399 001)
M-MuLV Reverse Transcriptase	(Roche # 11062 603 001)
Safe View DNA boyası	(abm # G108)

3.6.3 Hastaların karakteristik özellikleri

Çalışmaya alınacak hastalar seçilirken şu kriterler aranmıştır:

1. HCV kronik enfeksiyonu nedeniyle karaciğer nakli (KN) almak,
2. HBV, HDV ve HIV ile enfekte olmamak,
3. Nakil sonrasında tekrarlayan HCV enfeksiyonuna sahip olmak,
4. Nakil sonrası IFN-α2b+RBV sağaltımı alarak yanıtız olmak
5. HCV genotip 1 ile enfekte olmak.

Toplam 5 hastaya ait toplam 14 serum örneği kullanılmıştır. Tüm hastalar HCV genotip 1b ile enfektedir.

Üç hastadan 2'si (SA ve SK) 48 haftalık sağaltım alırken, 1 hasta (NE) orak hücre anemisi nedeniyle KN sonrası klasik sağaltım almamış, diğer iki hasta ise (NK ve MB) yan etkiler nedeniyle sırasıyla 28 hafta ve 24 hafta sağaltım almışlardır.

Çalışma boyunca hiçbir hasta hayatını kaybetmemiştir.

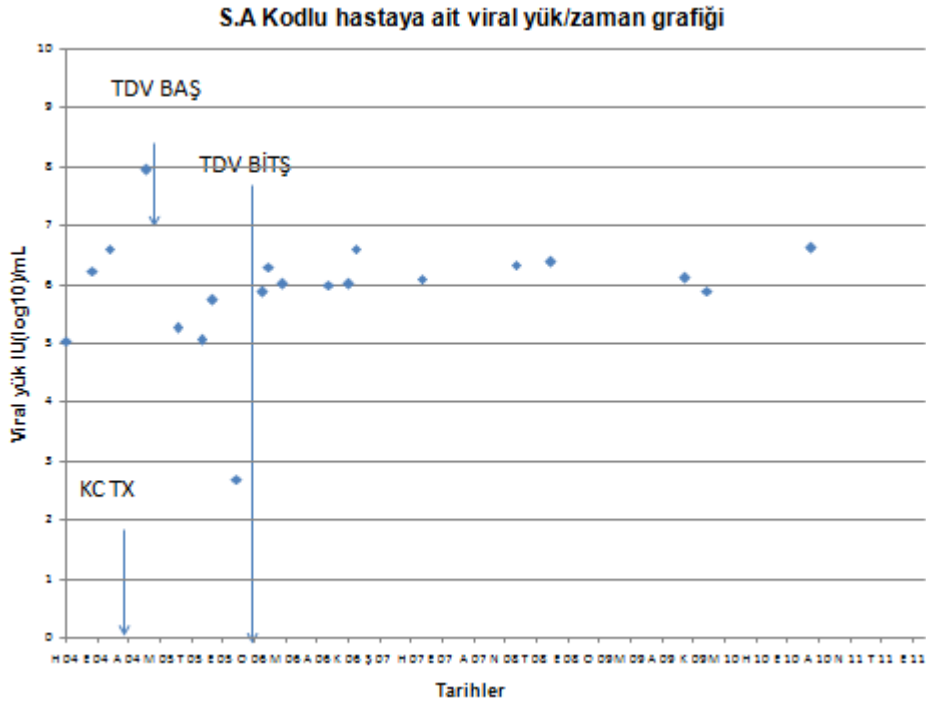
Hastalardan sadece MB KVY geliştirmiştir ancak enfeksiyon, sağaltım bitiminden 1 yıl sonra tekrarlamıştır. Bu hastanın sağaltım bitimini takiben, Ocak 2011 tarihinde 4 ünite olmak üzere, Mart 2011, Nisan 2011 ve Haziran 2011'de birer ünite kan transfüzyonu aldığı bilinmektedir.

Hastaların bazı özellikleri tablo 7'de gösterilmiştir.

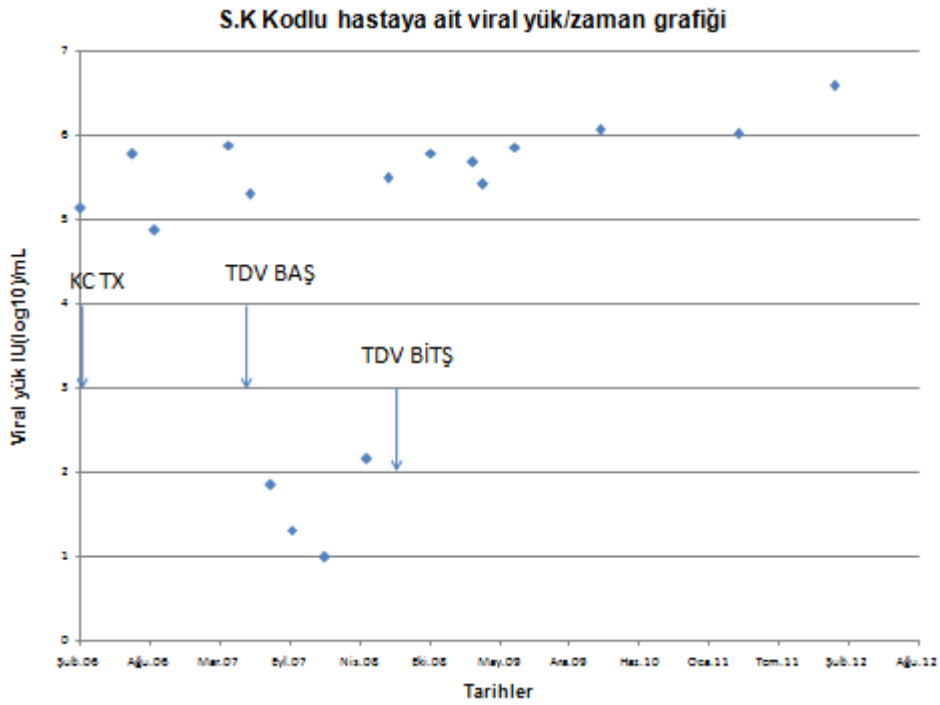
Tablo 7. Hastaların karakteristik özellikleri

	SA	SK	MB	NK	NE
Yaş	70	67	71	44	67
Cinsiyet	Erkek	Kadın	Kadın	Erkek	Kadın
Nakil öncesi viral yük IU/mL	1700000	Ulaşılamıyor	Ulaşılamıyor	10520	442000
Nakil sonrası sağaltım öncesi viral yük IU/mL	88000000	761380	3350000	1831729	Sağaltım almıyor
Bağışıklık baskılayıcı ilaç	Tacrolimus	Tacrolimus	Tacrolimus	Tacrolimus	Tacrolimus

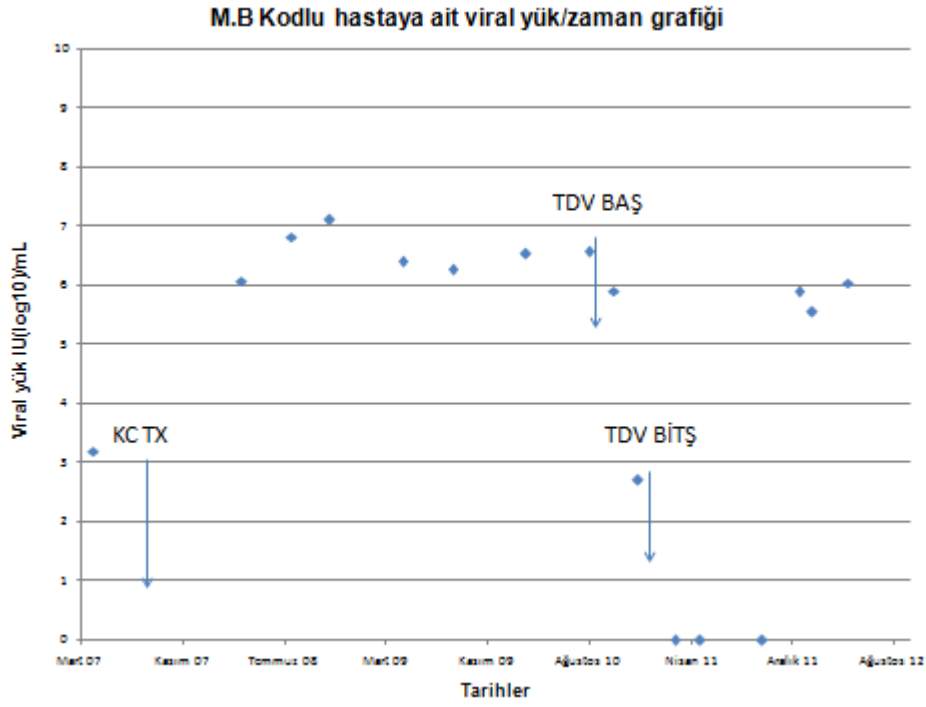
Tablo 8. SA kodlu hastaya ait viral yük/zaman grafiği



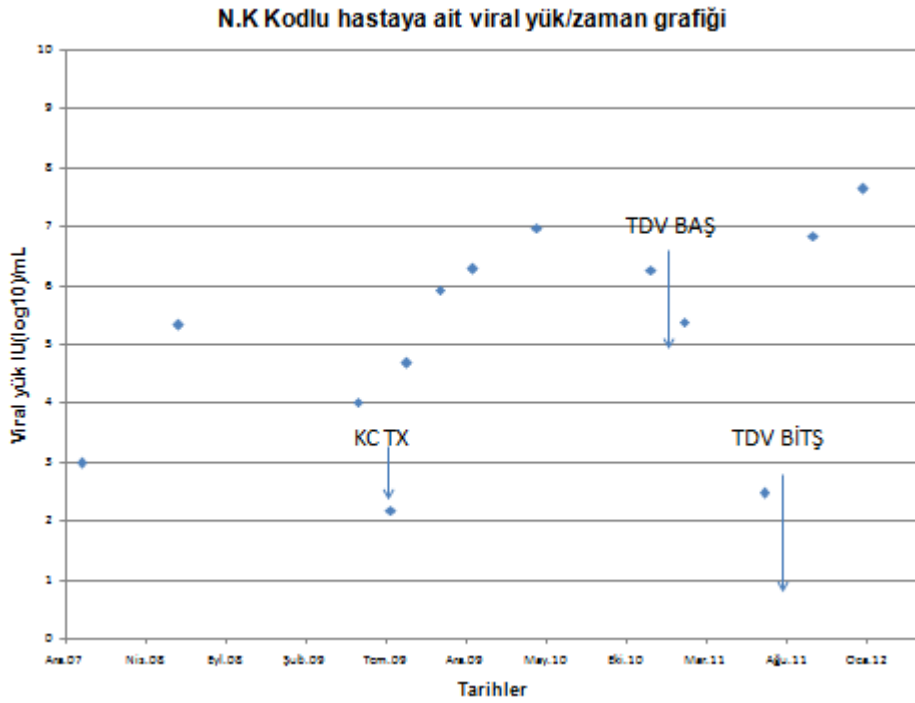
Tablo 9. SK kodlu hastaya ait viral yük/zaman grafiği



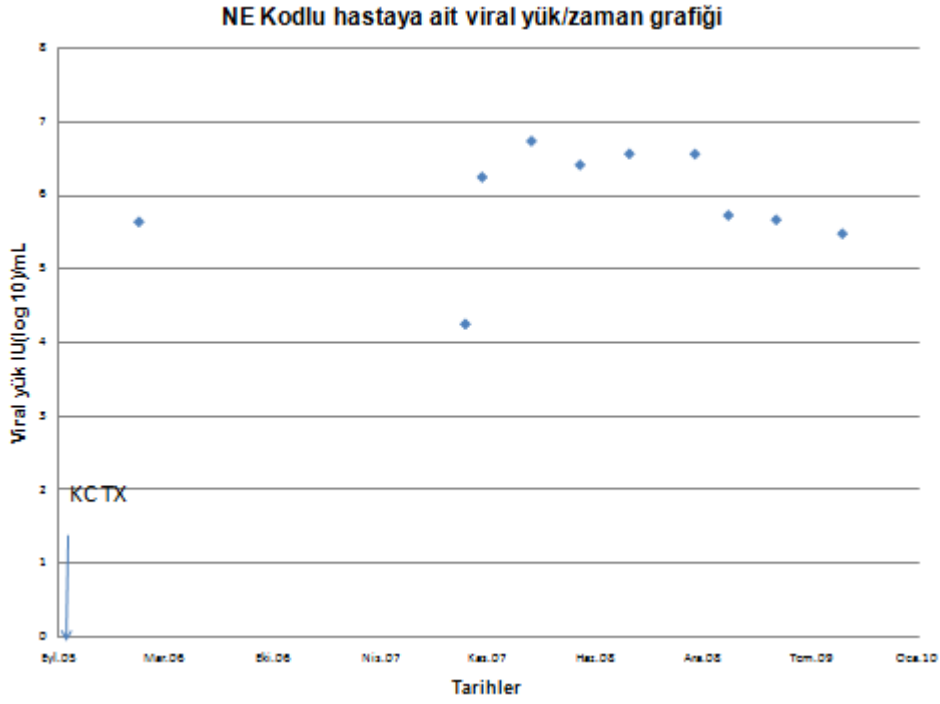
Tablo 10.MB kodlu hastaya ait virak yük/zaman grafiği



Tablo 11. NK kodlu hastaya ait virak yük/zaman grafiği



Tablo 12. NE kodlu hastaya ait viral yük/zaman grafiği



3.6.3.1 Çalışmada kullanılmak üzere seçilen serum örnekleri

Çalışmaya alınan hastalar, karaciğer nakli olmaları nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı arşivinde pek çok serum örneğine sahiptirler.

Çalışma bütçesi nedeniyle değerlendirilecek serum örneği sınırlı olduğundan serumların seçilmesinde bazı kriterler göz önünde bulundurulmuştur. Viral yükü bilinen serumlar içinden,

1. KN öncesi 1 örnek (varsa),
2. KN sonrası sağaltım öncesi en yüksek viral yüke sahip,
3. Sağaltım sonrasına en yakın tarihli,
4. Hastanın çalışmanın başlama zamanına en yakın tarihli serumu seçilerek çalışmaya alınmıştır.

Sadece NK'nın KN öncesi serumu çalışmaya alınmıştır. Diğer hastaların KN tarihlerinin 2008'den eski olması nedeniyle, KN öncesi serum örneklerine ulaşılamamıştır.

Üç hastadan 2'si(SA ve SK) 48 haftalık sağaltımı alırken, 1 hasta (NE) orak hücre anemisi nedeniyle KN sonrası klasik sağaltım almamış, diğer iki hasta ise(NK ve MB) yan etkiler nedeniyle sırasıyla 28 hafta ve 24 hafta sağaltım almışlardır.

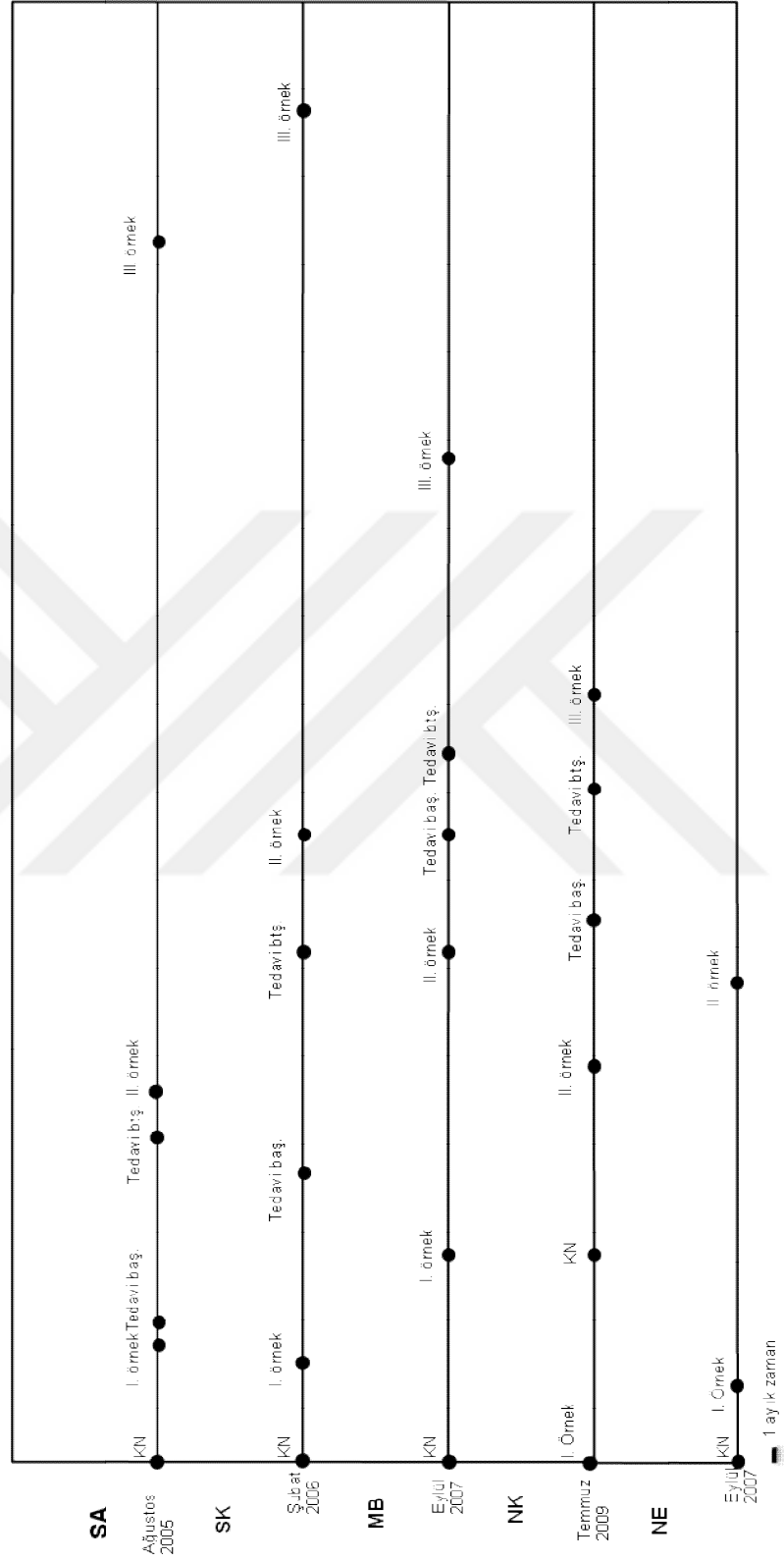
Hastalardan sadece MB KVY geliştirmiştir ancak enfeksiyon, sağaltım bitiminden 1 yıl sonra tekrarlamıştır. Hasta MB'nin sağaltım bitimini takiben, Ocak 2011'de 4 ünite olmak üzere, Mart 2011,Nisan 2011 ve Haziran 2011'de 1'er ünite kan transfüzyonu aldığı bilinmektedir.

Çalışmaya alınan hastalardan NK'nın çalışmanın bitiş tarihinden sonra telaprevir proteaz inhibitörü ile üçlü sağaltım alıp KVY geliştirdiği bilinmektedir. Diğer hastaların ise henüz üçlü sağaltım almadıkları bilinmektedir.

Çalışma boyunca hiçbir hasta hayatını kaybetmemiştir.

Hastaların çalışmaya alınan serum örnekleri tablo 13'de gösterilmiştir.

Tablo 13. Çalışmaya alınan serum örneklerine ait zaman çizelgesi



3.6.4. Dizilenecek HCV Genomunun NS3 Bölgesi Eldesi

3.6.4.1. NS3 bölgesi için öncül tasarımı

Yuvalanmış PZT için iki çift öncül belirlendi. Öncüllerin hangi bölgeyi çoğaltacağını belirlemek amacıyla HCV veri bankasına (<http://hcv.lanl.gov>) kayıtlı genotip 1b'lerin nükleotit dizileri indirildi ve BioEdit programı 7.2.5 sürümü ile hizalandı. NS3 bölgesini 4 parça halinde çoğaltmak üzere 8 farklı öncül üst üste çakışacak şekilde, korunmuş bölgeler seçilerek tasarlandı.

Öncüller

1) NS3 ileri öncül:

5'-TTG CGC CTA TCA CGG CCT AC- 3'

2) IN1 geri öncül:

5'-GAY GAG TTG TCC GTR AAG A-3'

3)IN2 ileri öncül:

5'- AAG GCG GTG GAC TTT RTA CC-3'

4)IN2 geri öncül:

5'-TTG CCA TAG AAG GGG ATC TC-3

5)IN3 ileri öncül:

5'-TGC CAC ATC CCA ACA TTG AGG-3'

6)IN3 geri öncül:

5'-CAA GCA CAG CCC GCG TCA TA-3'

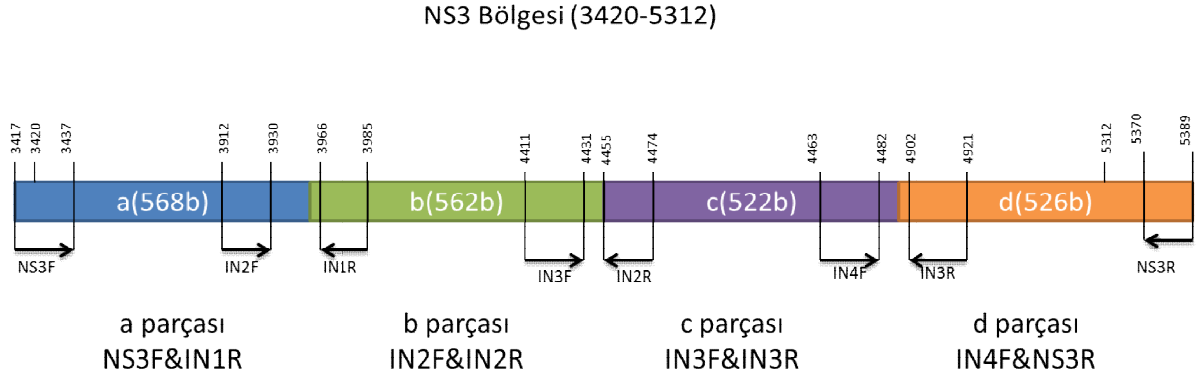
7)IN4 ileri öncül:

5'-CCY TCG GGC ATG TTC GAT TC-3'

8) NS3 geri öncül:

5'-ACA ATG ACC ACG CTG CCT GT-3'

Koyu boyalı yerler dejenere bazıları göstermektedir. Şekil 8.'de öncüllerin AF009606 referans dizisine göre çoğalttıkları nükleotit pozisyonları gösterilmektedir.



Şekil 8. Kullanılan öncüller ve NS3 bölgesi üzerinde çoğalttıkları parçalar

3.6.4.2. RNA ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu EZ1 Easy Virus Mini kit (Qiagen, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir.

3.6.4.3. cDNA eldesi

Tüm örneklerden "random hexamer" kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Kontaminasyonu engellemek için hastaların örnekleri 5'erli setler halinde çalışıldı.

cDNA sentezi:

5 µL kalıp RNA üzerine.

1. 1 µL 10 pmol Random Hexamer ve 1µL 10mM dNTP eklendi.
2. Tüpler ısı döngü cihazında (Techne TC-412) 65°C'da 5 dakika inkübe edildi ve ardından buzda soğutuldu.
3. 5,5 µL DEPIC-treated water, 4µL 5x reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitöründen 1µL (20u) eklendi. Son hacim 19µL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.
4. Karışım ısı döngü cihazında
25°C'da 10'
37°C'da 60'
70°C'da 10' inkübe edildi.

5. Reaksiyon bitiminde 4°C'da soğutuldu.
6. Sentezlenen cDNA -20°C'da saklandı.

3.6.4.4. NS3 Bölgesinin PZT ile çoğaltılması

Dizi analizinde kolaylık sağlamak için 1893 baz büyüklüğündeki NS3 bölgesinin 4 parça halinde çoğaltılmasına karar verildi. Parçalar a,b,c ve d olarak adlandırıldı.

NS3 ileri ve IN3 geri öncülleri kullanılarak PZT (1.PZT) yapıldı. Bu PZT ürünleri kalıp olarak kullanılarak a,b,c parçaları çoğaltıldı. IN3 ileri ve NS3 geri öncülleriyle gerçekleştirilen PZT (2.PZT) ürünleri kalıp olarak kullanılarak d parçası çoğaltıldı.

1.PZT NS3 ileri ve IN3 geri öncüllerle çoğaltma:

Karışım 50 µL hacimde hazırlandı.

Distile su	36,25µL
10x Taq Tampon MgCl ₂ 'lü (25mM)	5µL
dNTP (10mM)	1µL
NS3 ileri öncül (10pM)	1µL
IN3 geri öncül (10 pM)	1µL
Taq Polimeraz (5u/µL)	0,75µL
cDNA	5µL

PZT karışımı hazırlanarak,

95 °C'de 4 dakika ilk denatürasyon

94 °C'de 45 saniye }
58 °C'de 1 dakika } 30 döngü
72 °C'de 1 dakika }

72 °C'de 10 dakika son uzama

+4 °C'de bekleme programıyla çoğaltma gerçekleştirildi.

2.PZT IN3 ileri ve NS3 geri öncüllerle çoğaltma:

Karışım 50 µL hacimde hazırlandı.

Distile su	36,25µL
10x Taq Tampon MgCl ₂ 'lü (25mM)	5µL
dNTP (10mM)	1µL
IN3 ileri öncül (10pM)	1µL
NS3 geri öncül(10 pM)	1µL
Taq Polimeraz (5u/µL)	0,75µL
cDNA	5µL

PZT karışımı hazırlanarak,

95 °C'de 4 dakika ilk denatürasyon

94 °C'de 45 saniye
60 °C'de 1 dakika
72 °C'de 1 dakika

} 30 döngü

72 °C'de 10 dakika son uzama

+4 °C'de bekleme programıyla çoğaltma gerçekleştirildi.

a,b,c ve d parçalarının çoğaltılması

1.ve 2. PZT ürünleri kalıp olarak kullanılarak;

a parçası için; NS3 ileri IN1 geri

b parçası için; IN2 ileri IN2 geri

c parçası için IN3 ileri IN3 geri

d parçası için IN4 ileri NS3 geri öncül çiftleri kullanılarak 4 ayrı PZT yapıldı.

Karışım 50 µL hacimde hazırlandı.

Distile su	36,5µL
10x Taq Tampon MgCl ₂ 'lü (25mM)	5µL
dNTP (10mM)	1µL
İleri öncül (10pM)	1µL
Geri öncül(10 pM)	1µL
Taq Polimeraz (5u/µL)	0,5µL
Kalıp	5µL

PZT karışımı hazırlanarak,

95 °C'de 4 dakika ilk denatürasyon

94 °C'de 45 saniye
X°C'de 30 saniye
72 °C'de 45 saniye

} 35 döngü

72 °C'de 10 dakika son uzama

+4 °C'de bekleme programıyla çoğaltma gerçekleştirildi.

Her bir parça için Tablo 14.'de verilen bağlanma sıcaklıkları kullanıldı.

Tablo 14. a,b,c ve d parçaları için kullanılan bağlanma sıcaklıkları

	a parçası	b parçası	c parçası	d parçası
Bağlanma Sıcaklığı °C	55	55	60	58

3.6.4.5 Çoğaltılan parçaların jelde görüntülenmesi

1. Midi jel tankı kullanıldı. %1'lik agaroz oranını elde etmek için 100 ml Tris-Asetik-EDTA (TAE) içerisine 1 gram agaroz eklendi.
2. Agarozun çözünmesini sağlamak için ısıtma işleminden yararlanıldı.

3. Elde edilen karışımın içerisine 5 µl "SafeView" boyası eklendi. Karıştırıldı.
4. Hazırlanan karışım, jel tankındaki tarakları yerleştirilmiş olan tabağa döküldü ve donması için oda sıcaklığında bekletildi.
5. Jel donduktan sonra tabak, TAE ile doldurulmuş olan tank içerisine yerleştirildi.
6. Kuyucuklara örnekleri yüklemeyen önce her bir örnekten 10 µl alınıp 2 µl
7. loading dye (6x loading dye) ile karıştırıldı ve elde edilen karışım kuyucuklara aktarıldı.
8. Kuyucuklardan ilkinen marker, diğer kuyucuklara örnekler sırayla yüklendi
9. 120 volt ile 40 dakika elektroforez uygulandı.
10. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel tank içerisinden alındı ve UV ışığı altında görüntüleme yapıldı.
11. Jele yüklenen örneklerde amplikon olup olmadığı kalitatif olarak değerlendirildi.

3.6.5 PZT ürünlerinin dizi analizi

Çoğaltılan tüm amplikonlar dizi analizine gönderilmiştir. Dizileme tüm amplikonlar için ileri ve geri öncül ile iki tepkime olarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.6 Mutasyonların analiz edilmesi

Tüm bioinformatik analizler BioEdit programı 7.5.2 sürümüyle gerçekleştirilmiştir.

1. Elde edilen dizilerden, geri dizilerin ters komplementeri alınarak ileri dizi ile hizalanmıştır.
2. Geri ve ileri diziler arasındaki farklılıklar kromatogram üzerinde gözle kontrol edilerek düzeltilmiştir.
3. Tüm dizilere 1. ve 2. işlemler yapıldıktan sonra her bir örnek için 4 parçanın sekansı birleştirilmiş ve tek bir NS3 dizisi elde edilmiştir.
4. Tüm hizalamalarda referans dizi AF009606 kullanılmıştır.
5. Elde edilen 14 dizi, HCV veri bankasından (<http://hcv.lanl.gov>) indirilen dizilerle ClustalW programı kullanılarak hizalanmıştır.
6. Diziler daha sonra uygun protein kodlayan pencereyi bulabilmek için literatürde genotip 1b için kullanılan D90208 referans dizisiyle tekrar hizalanmıştır.

7. Avrupa, Amerika ya da Asya kılavuzlarında direnç mutasyonlarının saptanmasına ilişkin herhangi bir algoritma özellikle tavsiye edilmemektedir. Bu çalışmada Geno2Pheno (<http://hcv.geno2pheno.org>) internet sitesinden faydalanılmıştır.

3.6.7 Epitop Dizilerinin Korunmuşluk Analizi

Deneyssel olarak onaylanmış HCV NS3 bölgesinde bulunan CD8⁺ T-hücre epitopları 2 farklı veri bankasından indirilmiştir:

1. Los Alamos HCV immunology database (<http://hcv.lanl.gov/content/immuno/immuno-main.html>),

2. Immün Epitop veri bankası (<http://www.iedb.org/>).

İndirilen epitoplardan sadece NS3 bölgesinde bulunanlar ve HCV genotip 1 olarak bildirilenler seçilmiştir. Epitopların sadece enfekte insanlardan gelen HCV suşlarına ait olduğundan emin olmak için transgenik memeli hücreleri ve HLA tipi belirsiz olanlar dışlanmıştır. Bunun sonucunda analiz için 68 epitop elde edilmiştir (Tablo 6).

Epitopların korunmuşluk analizi Immün Epitop veri bankası *Epitopes Conservancy Tool* kullanılarak online ortamda yapılmıştır. (http://tools.iedb.org/tools/conservancy/iedb_input)

HCV genotip 1b dizisi D90208 de aynı epitop dizileri kullanılarak analiz edilmiştir.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Tablo 15. Araştırma Planı ve İş süreleri

İş Tanımı	2012	2013	2014	2015-2016
Tez konusunun belirlenmesi	Temmuz- Ağustos			
Etik kurul onayının alınması	Eylül			
Tez önerisinin onaylanması	Ekim			

Tez proje başvurusu		Ocak		
Tez projesinin kabul edilmesi		Haziran		
Malzemelerin teslim edilmesi		Kasım		
Öncül tasarımı		Aralık	Ocak	
Öncül optimizasyonları			Şubat-Mart	
Tüm genom çoğaltılması çalışmaları			Mart-Ağustos	
Deney tasarımının değiştirilmesi			Ağustos-Eylül	
Yeni Öncüllerin tasarlanması			Eylül-Kasım	
Öncül optimizasyonları			Kasım-Aralık	
PZT optimizasyonları			Ocak-Nisan	
Tüm örneklerin a,b,c,d parçalarının çoğaltılması			Mayıs-Eylül	
Örneklerin Sekanslanması			Eylül-Ekim	
Tezin Yazılması				Ekim-Ocak

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma sonucu elde edilen veriler bulgular kısmında açıklanmıştır.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmanın sınırlılıkları tartışma kısmında belirtilmiştir.

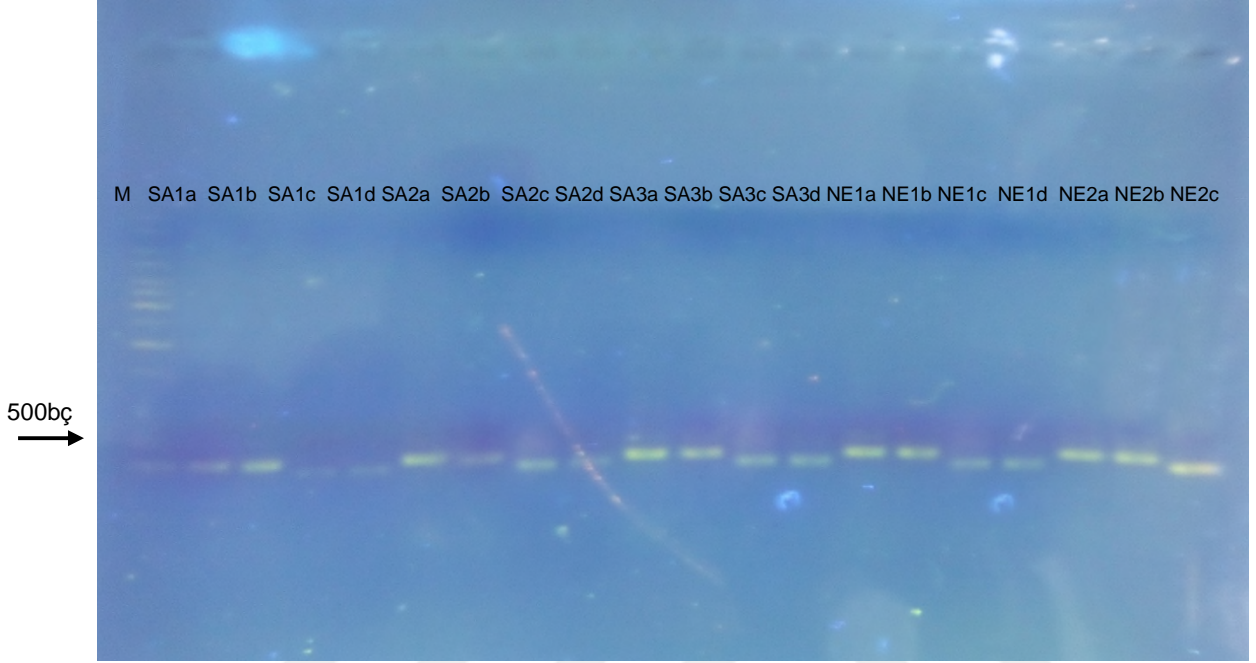
3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Değerlendirme Komisyonu'nun 13.09.2012 tarihli 2012/29-03 Nolu protokol kararı ekte verilmiştir.

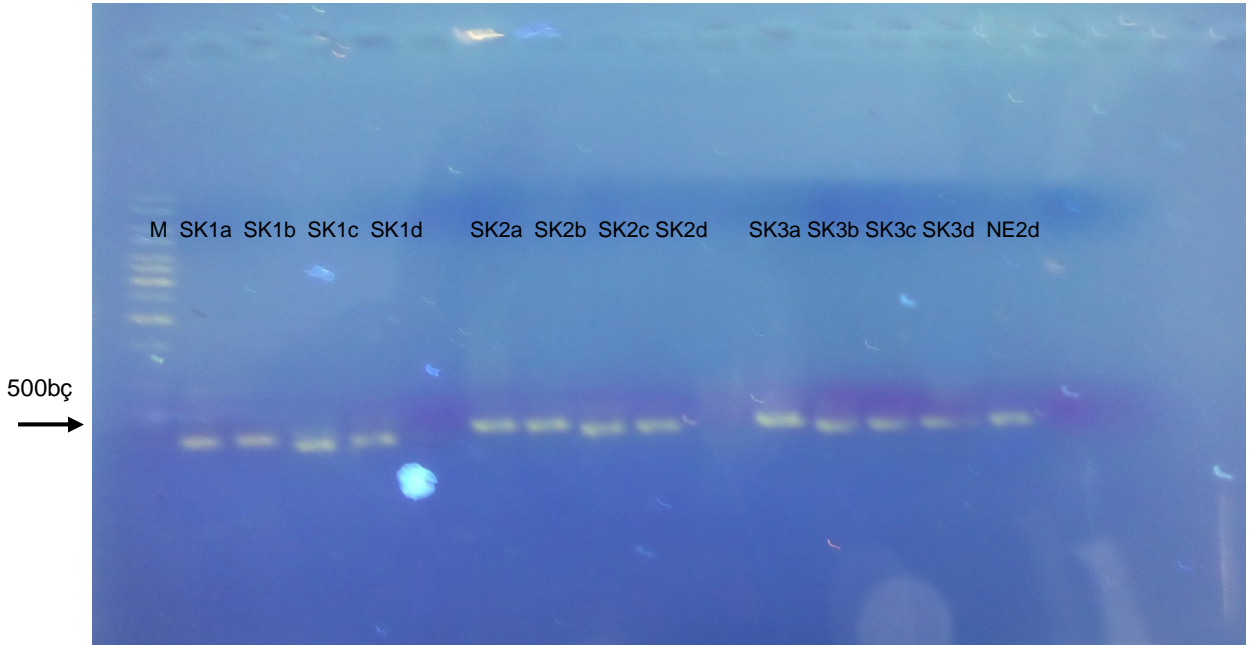
4. BULGULAR

4.1 Polimeraz Zincir Tepkimesi

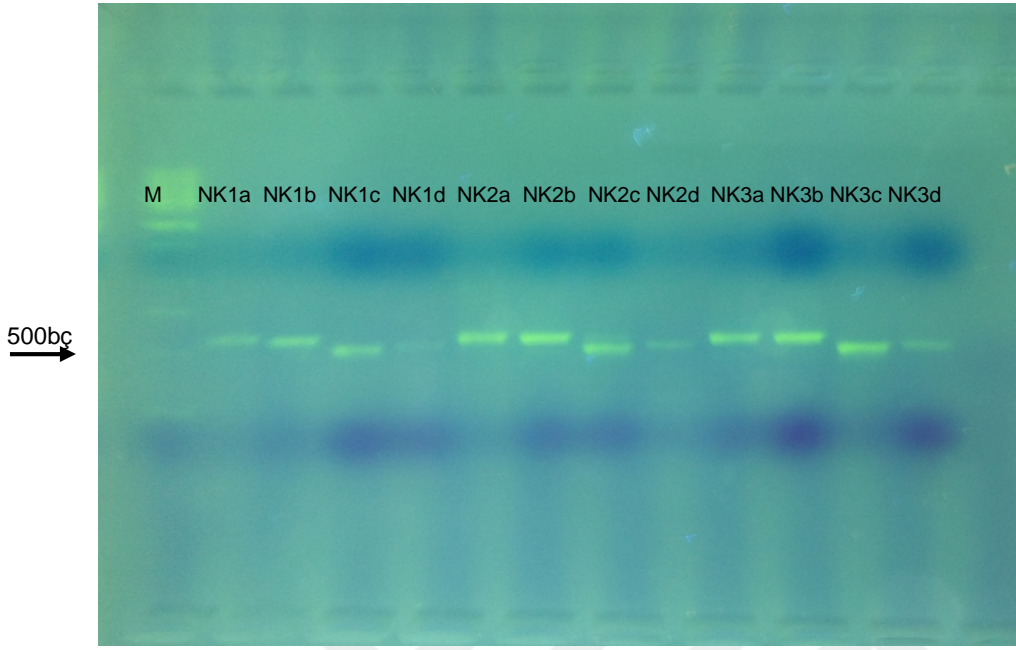
Gerçekleştirilen a,b,c ve d PZT'lerinin ürünlerinin %1 agaroz içeren jeldeki görüntüleri Şekil 9, 10, 11 ve 12'de görülmektedir.



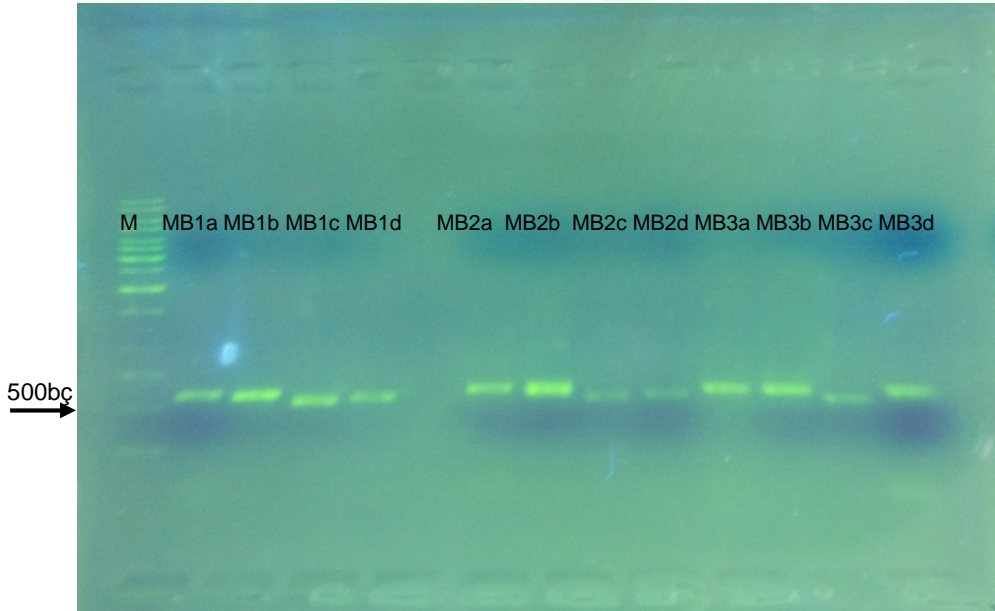
Şekil 9. SA ve NE kodlu hastalara ait PZT ürünleri*



Şekil 10.SK kodlu hastaya ait PZT ürünleri*



Şekil 11.NK kodlu hastaya ait PZT ürünleri*



Şekil 12. MB kodlu hastaya ait PT ürünleri*

4.2 PZT Ürünlerinin Dizilimi

Elde edilen ileri ve geri diziler alt alta hizalanarak nükleotit farklılıkları açısından incelenmiştir. Birkaç pozisyonda gözlenen farklılıklar kromatogram üzerinde kontrol edilerek gerekli yerlerde değişimler yapılmış veyadejenere bazlar kullanılarak ifade edilmiştir. Bu farklılıklara çoğunlukla, okuma hatalarının sıklıkla karşılaşıldığı bilinen dizinin başlangıç ve bitişinde bulunan ~30 bazlık kısımda rastlanmıştır.

4.3 Mutasyonların Analizi

Diziler, Telaprevir, Boceprevir, Simeprevir, Asunaprevir, Paritaprevir ve Grazoprevir proteaz inhibitörlerine karşı literatürde bildirilmiş olan direnç mutasyonları yönünden analiz edilmiştir. Hasta MB ve NK'da bilinen direnç mutasyonlarından hiç birine rastlanmamıştır.

SA'nın 1. örneğinde herhangi bir direnç mutasyonuna rastlanmazken, 2. örneğinde Telaprevir ve Boceprevir direncine yol açan 155G mutasyonu, 3. örneğinde ise sadece muhtemel dirençli 41R varyantı bulunmuştur.

SK'nın sadece 1. örneğinde dirençli varyant bulunmuştur. Bu varyant Simeprevir, Asunaprevir, Paritaprevir ve Grazoprevir'e karşı direnç oluşumuna neden olan 168A varyantıdır.

NE 'nin her iki örneğinde de Asunaprevir ve Grazoprevir'e karşı dirence neden olan 168G varyantı bulunmuştur.

Proteaz inhibitörlerine karşı dirençle ilişkilendirilen NS3 proteinin ilk 181 a.a'ı non-sinonim mutasyonlar yönünden incelenmiş ve bu bölgede en az non-sinonim mutasyona sahip (10 adet) hasta NK olarak bulunmuştur. En fazla non-sinonim mutasyona sahip hasta 41 mutasyonla SA iken onu sırasıyla 39 ile MB, 31 ile SK ve 13 ile NE izlemektedir. NK kodlu hastanın her üç örneğinde de aynı mutasyonlar görülmektedir. Hasta NE'de meydana gelen non-sinonim mutasyonlardan 11 tanesi her iki örneğinde de aynıdır. MB'nin 11, SA ve SK'nın 5 mutasyonu hastaların her üç örneğinde de de bulunmaktadır. SK kodlu hastanın mutasyonlarından 19 tanesi sadece üçüncü örneğinde saptanmıştır.

V114I ve I132V mutasyonları hastaların bütün örnekleri arasında ortak olarak görülmüştür. 170. pozisyonda da tüm örneklerde non-sinonim mutasyon görülmüştür.

Tablo 16.SA kodlu hastanın direnç durumu

İlişkili ilaç	SA1		SA2		SA3	
	Direnç Durumu	Mutasyon	Direnç Durumu	Mutasyon	Direnç Durumu	Mutasyon
Teloprevir	ilgili pozisyonda değişim	170V	dirençli	36V,55D,155G 170V	ilgili pozisyonda değişim	36V,55D, 170V
Boceprevir	ilgili pozisyonda değişim	170V	dirençli	36V,41R,55D 155G,170V	muhtemel dirençli	36V,41R, 55D,170V
Simeprevir	ilgili pozisyonda değişim	170V	dirençli	36V,80L,122N 155G,170V	ilgili pozisyonda değişim	36V,122N, 170V
Asunaprevir		yok	ilgili pozisyonda değişim	36V,41R,80L 155G	ilgili pozisyonda değişim	36V,41R
Grazoprevir		yok	dirençli	36V,155G	ilgili pozisyonda değişim	36V
Paritaprevir		yok		Yok		yok

Tablo 17.SK kodlu hastanın direnç durumu

İlişkili ilaç	SK1		SK2		SK3	
	Direnç Durumu	Mutasyon	Direnç Durumu	Mutasyon	Direnç Durumu	Mutasyon
Teloprevir	ilgili pozisyonda değişim	36V	ilgili pozisyonda değişim	36V	ilgili pozisyonda değişim	36V,170V
Boceprevir	ilgili pozisyonda değişim	36V,168A	ilgili pozisyonda değişim	36V	ilgili pozisyonda değişim	36V,170V
Simeprevir	dirençli	36V,168A	ilgili pozisyonda değişim	36V	ilgili pozisyonda değişim	36V,122N, 138L,170V
Asunaprevir	dirençli	36V,168A	ilgili pozisyonda değişim	36V	ilgili pozisyonda değişim	36V
Grazoprevir	dirençli	36V,168A	ilgili pozisyonda değişim	36V	ilgili pozisyonda değişim	36V
Paritaprevir	dirençli	168A		yok		yok

Tablo 18.MB kodlu hastanın direnç durumu

İlişkili ilaç	MB1		MB2		MB3	
	Direnç Durumu	Mutasyon	Direnç Durumu	Mutasyon	Direnç Durumu	Mutasyon
Telaprevir	ilgili pozisyonda değişim	170V,174S	ilgili pozisyonda değişim	36V,170V	ilgili pozisyonda değişim	170V,174S
Boceprevir	ilgili pozisyonda değişim	170V,174S	ilgili pozisyonda değişim	36V,170V	ilgili pozisyonda değişim	170V,174S
Simeprevir	ilgili pozisyonda değişim	122N,170V	ilgili pozisyonda değişim	36V,122N,138F,170V	ilgili pozisyonda değişim	170V
Asunaprevir		yok	ilgili pozisyonda değişim	36V		yok
Grazoprevir		yok	ilgili pozisyonda değişim	36V		yok
Paritaprevir		yok		yok		yok

Tablo 19.NK kodlu hastanın direnç durumu

İlişkili ilaç	NK1		NK2		NK3	
	Direnç Durumu	Mutasyon	Direnç Durumu	Mutasyon	Direnç Durumu	Mutasyon
Telaprevir	ilgili pozisyonda değişim	170V	ilgili pozisyonda değişim	170V	ilgili pozisyonda değişim	170V
Boceprevir	ilgili pozisyonda değişim	170V	ilgili pozisyonda değişim	170V	ilgili pozisyonda değişim	170V
Simeprevir	ilgili pozisyonda değişim	170V	ilgili pozisyonda değişim	170V	ilgili pozisyonda değişim	170V
Asunaprevir		yok		yok		yok
Grazoprevir		yok		yok		yok
Paritaprevir		yok		yok		yok

Tablo 20.NE kodlu hastanın direnç durumu

		NE1		NE2	
İlişkili ilaç	Direnç Durumu	Mutasyon	Direnç Durumu	Mutasyon	
Telaprevir	ilgili pozisyonda değişim	36V,170L	ilgili pozisyonda değişim	36V,170L	
Boceprevir	ilgili pozisyonda değişim	36V,168G,170L	ilgili pozisyonda değişim	36V,168G,170L	
Simeprevir	muhtemel dirençli	36V,168G,170L	muhtemel dirençli	36V,168G,170L	
Asunaprevir	dirençli	36V,168G	Dirençli	36V,168G	
Grazoprevir	dirençli	36V,168G	Dirençli	36V,168G	
Paritaprevir	ilgili pozisyonda değişim	168G	ilgili pozisyonda değişim	168G	



Tablo 21. NS3 bölgesi 1-181. kodonlar arasında hastalarda gözlemlenen non-sinonim mutasyonlar

Pozisyon	Referans	MB			NK			SA			NE		SK		
		MB1	MB2	MB3	NK1	NK2	NK3	SA1	SA2	SA3	NE1	NE2	SK1	SK2	SK3
13	L	M	L	L											
15	G							G	G	E					
17	I	L	I	I				I	F	I					
18	I	L	I	I											
19	T	N	T	T											
20	S	R	S	S				S	P	P			S	S	P
21	L												L	L	P
24	R	R	G	G											
25	D	D	A	A				D	DEL	DEL					
28	Q	Q	R	R											
30	D	E	E	E				D	E	K	E	E	E	E	E
34	Q	H	H	H											
36	L	V	V	V				L	V	V	V	V	V	V	V
39	A	A	E	A				A	V	V					
41	Q							Q	R	R					
46	T	S	S	S	S	S	S	S	T	T					
48	V	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I			
49	N	S	T	N				N	H	N					
55	V							V	D	D					
56	Y												F	Y	Y

61	S						S	T	S	
66	G	A	A	G			G	A	A	
68	K	N	N	K	T	T	T	T	K	R
71	I	F	I	I			I	S	S	
72	T	T	Y	T			T	T	P	
73	Q	P	Q	Q			Q	Q	P	
76	T	T	N	T						
77	N	H	H	Y	Y	Y	Y	H	H	
79	D						D	D	N	
80	Q						Q	L	Q	
86	P	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
89	P							S	S	
91	A	A	R	A						
92	R	R	G	R						
94	M	Q	Q	Q			M	F	L	
95	T	T	T	V	V	V	V	T	T	
97	C	S	C	C						
101	S	G	G	G	G	G	G	S	S	
108	T							S	S	
109	R						R	G	G	
112	D	D	G	D						
114	V	I	I	I	I	I	I	I	I	
122	S	N	N	S				N	N	
123	R							E	E	
								S	S	N
								R	R	E

130	R				R	K	R		R	R	Q
131	P	P	A	P		DEL	P		P	P	A
132	I	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
136	K				K	R	K			K	R
138	S	S	F	S						S	L
139	S									S	P
140	G				G	V	G			G	V
142	P				P	S	S				
146	P				P	L	P				
147	S				S	L	S	S	L		
149	H									H	C
150	V				V	A	V	A	V	V	V
151	V				V	R	V				
155	R					G					
156	R				R	G	R				
160	T	P	T	T							
161	R	G	G	R							
168	D							G	G	A	D
169	F				F	L	F	C	C	C	F
170	I	V	V	V	V	V	V	L	L	I	V
174	N	S	N	S							

4.4 Epitop Dizileri

Literatürde NS3 bölgesi için verilen epitoplar genotip düzeyinde olduğundan, elde edilen epitop dizilerinin korunmuşluk analizi öncelikle referans dizi D90208 (genotip 1b) ile gerçekleştirilmiştir.

İncelenen 68 epitoptan 26 tanesi referans D90208 (genotip 1b) ile %100 benzerlik göstermiştir. Analiz edilen epitopların referans dizilerle benzerlikleri Tablo 22'de gösterilmiştir.

Hasta örnekleri HCV genotip 1b olduğundan, epitopları değerlendirilirken genotip 1b referansı D90208 ile aynı benzerlik yüzdesine sahip diziler korunmuş olarak tanımlanmıştır. Hastaların epitop benzerlik analizi Tablo 23'de gösterilmiştir.

Epitop dizilerinden EP7, EP35, EP53 ve EP62 'nin hiç bir örnekte korunmamış olduğu görülmüştür. EP24 ise SA2 hariç tüm örneklerde korunmuştur.

Tüm örneklerinde aynı benzerlik motifine sahip olan tek hasta NE'dir.

MB hastasının 1. örneğinde incelenen 68 epitoptan 31'si (%45.5), 2. örneğinde 25'i(%36.7), korunmuştur. 3. örneğinde NS3'ün proteaz inhibitörüne ait 36-489. a.a'ler arası dizisi elde edilebilmiştir. Bu a.a'ler arasında 50 epitop bulunmaktadır ve bunlardan 20'si (%40) korunmuştur. Korunmuş epitoplardan 7'si 3 örnekte ortaktır. 1. ve 2. arasında 10 ortak epitop bulunurken, 2. ve 3. örnek arasında, 1. ve 3. arasında ortak korunmuş epitop bulunmamaktadır.

NE hastasının her iki örneğinde de aynı epitoplar (34 epitop %50) korunmuş durumdadır. Değişim gözlenen epitoplar da her iki örnek için aynıdır.

NK hastasının 1. örneğinde incelenen 68 epitoptan 31'u (%45.5), 2. örneğinde 24'ü (%35.8), 3. örneğinde 19'u (%28) korunmuştur. Korunmuş olan epitoplardan 6 tanesi 3 örnekte de ortaktır. 2. ve 3. örnek arasında 4 ortak, 1. ve 2. arasında 7 ortak, 1. ve 3. arasında da 7 ortak korunmuş epitop bulunmaktadır.

SA hastasının 1. örneğinde 39 (%57.3), 2. örneğinde 31 (%44.7) bulundurmaktadır. Üçüncü örneğinde bu sayı 28'e (%41) düşmüştür. 3 örneğin korunmuş epitoplarından 15'i ortaktır. 1.ve 2. örneğin korunmuş epitoplarından 11'i, 1. ve 3. örneğin 5'i ortaktır, 2. ve 3. örneğin ortak epitopu bulunmamaktadır.

SK hastasında 1. örneğinde 31 (%45.5), 2. örneğinde 38 (%55.8) ve 3. örneğinde 32 (%47) korunmuş epitop bulundurmaktadır. 3 örnekte bulunan korunmuş epitoplardan 22'si ortaktır. 1. ve 2. örneğin korunmuş epitolarından 5'i, 2. ve 3. örneğin 2'si, 1. ve 3. örneğin 1'i ortaktır.

Hastalar arasında en fazla korunmuş epitopa (39 %57.3) sahip olanlar NK ve SA'nın 1. örnekleridir. Örnekleri arasında en fazla ortak korunmuş epitopa sahip olan hasta ise NE'dir.

Tablo 22. Analiz edilen epitopların referans diziyile benzerlikleri

Epitop Adı	Epitoplar	NS3 Protein Pozisyonu	Genotip 1b D90208
EP1	CTCGSSDLY	97_105	%100
EP2	KLSGLGINAV	380_389	%80
EP3	ATDALMTGYT	410_419	%90
EP4	AATLGFGAYMSKAH G	233_247	%100
EP5	TLGFGAYMSK	235_244	%100
EP6	GAYMSKAHGV	239_248	%90
EP7	GLLGCIIITSLTGRDKN QVDGEVQVLSTATQS FLATCVNGVCWTVY	12-56	%100
EP8	TLTHPVTK	610_617	%87.5
EP9	LLGCIITSL	13_21	%100
EP10	QTFLATCINGVCWTV	41_55	%86.67
EP11	ATCINGVCWTVYHGA	45_59	%93.33
EP12	CINGVCWTV	47_55	%88.89
EP13	YLVTRHADV	105_113	%100
EP14	LLCPAGHAV	143_151	%77.78
EP15	HAVGIFRAA	149_157	%88.89
EP16	GYKVLVLNPSVAAT	222_235	%100
EP17	GVDPNIRTGV	247_256	%80
EP18	TITTGAPVTYSTY GK	258_272	%80
EP19	TGSPITYSTY	261_270	%90

EP20	DELAACLVALGINAV	375_389	%80
EP21	LAACLVALGINAVAY	377_391	%80
EP22	AKLVALGINAVAYYR	379_393	%80
EP23	KLVALGINAV	380_389	%70
EP24	GLNAVAYYR	385_393	%100
EP25	GFTGDFDSV	417_425	%100
EP26	SVIDCNTCV	424_432	%100
EP27	YLVAYQATV	559_567	%100
EP28	QMWKCLIRL	580_588	%100
EP29	TAYSQQTRGLLG	4_15	%83.33
EP30	AYSQQTRGL	5_13	%88.89
EP31	VYHGAGNKTL	55_64	%90
EP32	MYTNVDQDL	74_82	%100
EP33	ITYSTYGKF	265_273	%88.89
EP34	TYSTYGKFL	266_274	%88.89
EP35	FYGKAIPIEAI	349_359	%100
EP36	GYTGDFDSVI	417_426	%90
EP37	EFWEAVFTGL	530_539	%90
EP38	CINGVCWTV	47_55	%88.89
EP39	TVYHGAGTK	54_62	%88.89
EP40	HLHAPTGS GK	201_210	%100
EP41	ATLGFGAYMSKA	234_245	%100
EP42	LGFGAYMSK	236_244	%100
EP43	LIFCHSKKK	365_373	%100
EP44	ALGINAVAY	383_391	%77.78
EP45	VTLTHPITK	609_617	%100
EP46	HAVGIFRAAV	149_158	%90
EP47	RLGAVQNEV	601_609	%100
EP48	YMSKAYGTDP	241_250	%70
EP49	YGTDPNIRTG	246_255	%70
EP50	YSTYGKFLAD	267_276	%90
EP51	STDATSILGI	294_303	%80
EP52	HPNIEEVAL	333_341	%100
EP53	YGKAIPLEVI	350_359	%53
EP54	RPSGMFDSVVL	481_491	%90.91
EP55	TPAETTVRL	505_513	%88.89

EP56	NQVEGEVQI	27_35	%77.78
EP57	CHAQDATSVL	292_301	%50
EP58	VDFVPVESM	167_175	%88.89
EP59	IPFYGKA IPL	347_356	%90
EP60	RAQAPPSW	570_578	%100
EP61	WPAPSGARSL	85_94	%80
EP62	LSPRPVSYLK	127_136	%77.78
EP63	HPNIEEVALS	333_342	%100
EP64	ELA AKLVAL	376_384	%80
EP65	LIRLKPTL	585_592	%100
EP66	EVTLTHPITKYIMTCM	608_625	%94.44
	SA		
EP67	TLTHPITK	610_617	%100
EP68	HPITKYIMACMSADL	613_627	%100

Tablo 23. Hastaların referans diziyeye göre epitop benzerlik analizi

Epitoplar	Genotip 1b D90208	SA1	SA2	SA3	SK1	SK2	SK3	NK1	NK2	NK3	MB1	MB2	MB3	NE1	NE2
CTCGSSDLY	%100	%100	%100	%100	%88.89	%100	%100	%77.78	%100	%100	%77.78	%88.89	%88.89	%100	%100
KLSGLGINAV	%80	%90	%70	%80	%90	%90	%90	%80	%80	%90	%80	%80	%80	%80	%80
ATDALMTGYT	%90	%90	%90	%90	%90	%90	%90	%70	%90	%80	%100	%90	%100	%90	%90
AATLFGAYMSKAHI	%100	%100	%100	%93.33	%93.33	%93.33	%93.33	%93.33	%93.33	%93.33	%100	%80	%86.67	%100	%100
TLGFGAYMSK	%100	%100	%100	%100	%90	%90	%100	%90	%100	%90	%100	%80	%90	%100	%100
GAYMSKAHGV	%90	%90	%90	%80	%100	%100	%80	%90	%80	%90	%100	%90	%80	%100	%100
TLTHPVTK	%87.5	%87.5	%87.5	%62.5	%75	%87.5	%75	%87.5	%75	%75	%87.5	%87.5	yok	%87.5	%87.5
GLLCIITSLTGRDK															
NQVDGEVQVLSTA															
TQSFLATCVNGVC															
WTVY	%100	%77.78	%73.33	%75.56	%88.89	%95.56	%86.67	%82.2	%93.33	%93.33	%73.33	%77.78	yok	%93.33	%93.33
LLGCIITSL	%100	%66.67	%66.67	%66.67	%88.89	%100	%77.78	%66.67	%100	%100	%44.44	%100	yok	%100	%100
QTFLATCINGVCWTV															
V	%86.67	%80	%66.67	%80	%93.33	%86.67	%86.67	%73.33	%93.33	%93.33	%80	%66.67	%86.67	%93.33	%93.33
ATCINGVCWTVYH															
GA	%93.33	%93.33	%80		%86.67	%93.33	%86.67	%80	%100	%100	%86.67	%73.33	%93.33	%100	%100
CINGVCWTV	%88.89	%88.89	%66.67	%88.89	%88.89	%88.89	%88.89	%77.78	%100	%100	%88.89	%66.67	%100	%100	%100
YLVTRHADV	%100	%88.89	%88.89	%88.89	%100	%100	%88.89	%88.89	%100	%100	%88.89	%77.78	%100	%88.89	%88.89
LLCPAGHAV	%77.78	%66.67	%66.67	%66.67	%77.78	%88.89	%66.67	%66.67	%88.89	%77.78	%66.67	%66.67	%77.78	%88.89	%88.89
HAVGIFRAA	%88.89	%66.67	%77.78		%88.89	%100	%66.67	%88.89	%100	%88.89	%77.78	%77.78	%88.89	%100	%100
GYKVLVNLNPSVAAT	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%92.86	%71.43	%100	%100	%100
GVDPNIRTGV	%80	%80	%80	%80	%100	%100	%80	%100	%70	%100	90%	%100	%100	%100	%100
TITGAPVTYSTYGK	%80	%93.33	%93.33	%93.33	%86.67	%80	%93.33	%93.33	%86.67	%93.33	%86.67	%73.33	%86.67	%93.33	%93.33
TGSPITYSTY	%90	%70	%70	%70	%70	%70	%70	%90	%80	%90	%90	60%	%80	%90	%90
DELAACLVALGINAV	%80	%66.67	%60	%80	%80	%80	%80	%73.33	%80	%73.33	%80	%80	%80	%80	%80
LAACLVALGINAVAY	%80	%73.33	%66.67	%80	%80	%80	%80	%80	%80	%66.67	%73.33	%73.33	%73.33	%80	%80
AKLVALGINAVAYYR	%80	%73.33	%66.67	%80	%80	%80	%80	%80	%80	%60	%73.33	%73.33	%73.33	%80	%80
KLVALGINAV	%70	%70	%60	%70	%70	%70	%70	%70	%70	%70	%70	%70	%70	%70	%70
GLNAVAYYR	%100	%100	%88.89	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%66.67	%88.89	%88.89	%88.89	%100	%100
GFTGDFDSV	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%66.67	%88.89	%100	%88.89	%100	%100

SVIDCNTCV	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%77.78	%77.78	%55.56	%100	%100	%100	%88.89	%88.89
YLVAYQATV	%100	%88.89	%100	%66.67	%100	%100	%100	%88.89	%77.78	%66.67	%88.89	%88.89	yok	%77.78	%77.78
QMWKCLIRL	%100	%100	%77.78	%66.67	%100	%100	%100	%100	%55.56	%55.56	%100	%100	yok	%100	%100
TAYSQQTRGLLG	%83.33	%83.33	%100	%91.67	%100	%91.67	%100	%66.67	%100	%100	%83.33	%100	yok	%100	%100
AYSQQRGL	%88.89	%88.89	%100	%100	%100	%88.89	%100	%77.78	%100	%100	%88.89	%100	yok	%100	%100
VYHGAGNKT	%90	%80	%80	%60	%80	%90	%80	%90	%90	%90	%90	%90	%90	%90	%90
MYTNVDQDL	%100	%88.89	%77.78	%77.78	%100	%100	%88.89	%88.89	%100	%100	%88.89	%77.78	%88.89	%100	%100
ITYSTYGKF	%88.89	%88.89	%88.89	%88.89	%88.89	%100	%88.89	%100	%100	%100	%100	%100	%88.89	%100	%100
TYSTYGKFL	%88.89	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%88.89	%100	%100
FYGKAIPIEAI	%100	%45.45	%63.64	%81.82	%81.82	%81.82	%81.82	%54.55	%63.64	%81.82	%72.73	%81.82	%90.91	%90.91	%90.91
GYTGDFDSVI	%90	%90	%90	%90	%90	%90	%90	%90	%80	%60	%100	%90	%100	%90	%90
EFWEAVFTGL	%90	%90	%40	%50	%90	%90	%90	%90	%90	%70	%90	%90	yok	%90	%90
CINGVCWTV	%88.89	%88.89	%66.67	%88.89	%88.89	%88.89	%88.89	%77.78	%100	%100	%88.89	%66.67	%100	%100	%100
TVYHGAGTK	%88.89	%77.78	%77.78	%55.56	%77.78	%100	%77.78	%88.89	%88.89	%88.89	%88.89	%88.89	%88.89	%88.89	%88.89
HLHAPTGS	%100	%100	%100	%100	%100	%80	%100	%100	%80	%90	%90	%90	50%	%80	%80
ATLGFAYMSKA	%100	%100	%100	%100	%91.67	%91.67	%100	%91.67	%100	%91.67	%100	%83.33	%86.67	%100	%100
LGFGAYMSK	%100	%100	%100	%100	%88.89	%88.89	%100	%88.89	%100	%88.89	%100	%77.78	%88.89	%100	%100
LIFCHSKK	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%55.56	%88.89	%55.56	%100	%100	%100	%100	%100
ALGINAVAY	%77.78	%77.78	%66.67	%77.78	%77.78	%77.78	%77.78	%77.78	%77.78	%55.56	%66.67	%66.67	%66.67	%77.78	%77.78
VTLTHPITK	%100	%100	%100	%77.78	%88.89	%100	%88.89	%100	%77.78	%77.78	%100	%100	yok	%100	%100
HAVGIFRAAV	%90	%70	%80	%80	%90	%100	%70	%90	%100	%90	%80	%80	%90	%100	%100
RLGAVQNEV	%100	%88.89	%100	%55.56	%100	%88.89	%88.89	%100	%77.78	%77.78	%100	%100	yok	%100	%100
YMSKAYGTDP	%70	%70	%70	%80	%80	%80	%80	%70	%60	%70	%80	%70	60%	%80	%80
YGTDPNIRTG	%70	%70	%70	%80	%80	%80	%80	%80	%60	%80	%70	80%	80%	%80	%80
YSTYGKFLAD	%90	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%90	%100	%100
STDATSILGI	%80	%80	%80	%80	%90	%70	%80	%80	%60	%80	%70	%90	%80	%80	%80
HPNIEEVAL	%100	%100	%100	%88.89	%100	%100	%88.89	%100	%100	%100	%100	%44.44	%66.67	%100	%100
YGKAIPLEVI	%53.33	%70	%60	%80	%100	%100	%100	%70	%60	%70	%80	%80	90%	90%	90%

RPSGMFDSVVL	%90.91	%81.82	%72.73	%90.91	%90.91	%90.91	%90.91	%81.82	%81.82	%81.82	%90.91	%90.91	yok	%81.82	%81.82
TPAETTVRL	%88.89	%66.67	%88.89	%44.44	%88.89	%88.89	%88.89	%55.56	%55.56	%55.56	%66.67	%88.89	yok	%66.67	%66.67
NQVEGEVQI	%77.78	%66.67	%88.89	%77.78	%88.89	%88.89	%66.67	%77.78	%88.89	%88.89	%77.78	%66.67	yok	%88.89	%88.89
CHAQDATSVL	%50	%50	%50	%50	%60	%40	%50	%50	%40	%50	40%	%60	%50	%66.67	%66.67
VDFVPVESH	%88.89	%100	%88.89	%100	%66.67	%88.89	%100	%100	%88.89	%100	%100	%100	%100	%66.67	%66.67
IPFYGKAJPL	%90	%60	%60	%80	%100	%100	%100	%70	%90	%90	%80	%80	%90	%90	%90
RAQAPPSW	%100	%100	%100	%55.56	%100	%100	%100	%100	%77.78	%66.67	%100	%100	yok	%100	%100
WPAPSGARSL	%80	%80	%70	%80	%80	%80	%70	%90	%90	%90	%70	50%	%70	%100	%100
LSPRPVSYLK	%77.78	%70	%70	%100	%100	%100	%70	%90	%100	%100	%80	%70	%100	%100	%100
HPNIEEVALS	%100	%100	%100	%80	%100	%100	%80	%100	%100	%100	%100	40%	%70	%100	%100
ELAAKLVAL	%80	%66.67	%66.67	%77.78	%77.78	%77.78	%77.78	%66.67	%77.78	%66.67	%77.78	%77.78	%77.78	%77.78	%77.78
LIRLKPTL	%100	%100	%37.5	%50	%100	%100	%100	%100	%50	%75	%100	%100	yok	%87.5	%87.5
EVTLHPITKYIMTC															
MSA	%94.44	%94.44	%94.44	%72.22	%88.89	%88.89	%83.33	%94.44	%72.22	%72.22	%94.44	%94.44	yok	%94.44	%94.44
TLTHPITK	%100	%100	%100	%75	%87.5	%100	%87.5	%100	%87.5	%87.5	%100	%100	yok	%100	%100
HPITKYIMACMSADL	%100	%100	%100	%73.33	%100	%100	%100	%100	%73.33	%73.33	%100	%100	yok	%100	%100

5. TARTIŞMA

Karaciğer alıcılarının en büyük sorunlarından biri organ naklini takip eden sürede sağlıklı karaciğerin tekrar HCV ile enfekte olmasıdır. Bağışıklık sistem baskılayıcı tedavi altında enfeksiyonun seyri, bağışıklık sistemi baskılanmayan akut enfeksiyonlu olan hastalara göre daha hızlıdır. Genelde nakil sonrasında serumda viral yük, nakil öncesine göre 1 log daha yüksektir ve nakil sonrası kısa sürede ciddi organ hasarı meydana gelmektedir. Karaciğer alıcılarındaki bu hızlı enfeksiyon gelişimi, görece daha kısa zamanda hastalığın seyri hakkında bilgi toplanmasına olanak sağlar. Bu nedenle karaciğer alıcıları HCV patogenezinin anlaşılabilmesi adına özel bir fırsat sunmaktadır (69).

Çalışmaya sadece genotip 1 ile enfekte olan hastalar alınmıştır. Bu hastaların seçilmesinin nedeni, Türkiye'de rastlanan HCV genotiplerinin arasında genotip 1 kökenin en yaygın olduğunun literatür derlemesi sonucunda belirlenmesidir. Bir başka önemli belirleyici unsur ise ilk dalga proteaz inhibitörü olan Telaprevir ve Boceprevir'in sadece genotip 1 enfeksiyonu için geliştirilmiş olmasıdır.

Karaciğer nakli sonrasında serumda bulunan viral RNA kısa sürede yeni organı da enfekte etmektedir. Bağışık sistemi baskılanan organ alıcılarında klasik sağaltım, görece daha az etkilidir ve bu hastalarda kalıcı viral yanıt daha nadir sağlanabilmektedir (13). Bu açıdan proteaz inhibitörleri, özellikle nakil sonrası klasik sağaltıma yanıtız hastaların tedavisinde umut vaatmektedir.

Yeni nesil inhibitör ilaçların geliştirilmesi, HCV antiviral sağaltımında önemli ilerlemeler sunmaktadır. Buna karşın bu ilaçlara karşı oluşan dirençli varyantlar, diğer kronik viral enfeksiyonlarda da olduğu gibi sorunların başında gelmektedir. Sağaltım yanıtızlığının mekanizmaları tam anlamıyla aydınlatılamamış INF+RBV standart sağaltımının aksine, DEA'lara karşı oluşan direnç mekanizması, ilacın hedef aldığı bölgede oluşan mutasyonların seçilimi olarak açıklanmıştır.

Çalışmada HCV enfeksiyonu nedeniyle karaciğer hasarı meydana gelmiş ve organ nakli almış hastalar seçilmiştir. Özellikle nakil hastalarının seçilmesinin nedeni bu hasta grubuyla yapılan çalışmaların kısıtlı olması ve hastaların organ nakli

nedeniyle aldıkları immün sistemi baskılayıcı ilaçların viral populasyon üzerindeki etkilerinin incelenmek istemesidir.

Çalışmada incelenen hastalar, klasik tedaviye yanıtızsız, nakil sonrası da klasik sağaltım alıp KVV geliştirememiş hastalar olduğundan DEA'larla sağaltım açısından adaydırlar. Çalışmada, DEA'larla sağaltıma başlanmadan önce hastalarda bu ilaçlara karşı oluşmuş dirençli varyantların durumu incelenerek bu ve benzeri hastaların sağaltımlarına katkıda bulunmaya çalışılmıştır.

Literatürde proteaz inhibitörlerine karşı oluşan dirençli varyantlara yönelik klasik sekanslama yöntemiyle yapılan çalışmalarda dirençli varyantların görüldüğü ilk 181 a.a'lık kısım dizilenmektedir (18, 62) Buna karşın bizim çalışmamızda tüm NS3 bölgesi (631 a.a) dizilerek proteaz inhibitörlerine direncin yanında NS3 bölgesindeki epitoplarda meydana gelen mutasyonlar da incelenmiştir.

Beş hastada ortak olarak görülen non-sinonim mutasyonlar ve beş hastada ortak olarak görülen korunmamış epitop dizileri analizlerde kullanılan referans diziden kaynaklanmış olabilir. Referans dizinin orijini Japonya'dır ve literatürde aynı suptipler arasında coğrafik farklılıkların olabileceği bilinmektedir (40, 93). Referans dizinin seçim nedeni, literatürde genotip 1b ile yapılan çalışmalarda referans olarak D90208'in kullanılmasıdır (2, 81, 115)

Çalışmamızda, ilaç dirençli varyantların analizi için Max Planck İnfomatik Enstitüsü'nün geliştirmiş olduğu "www.geno2pheno.com" internet sitesinden faydalanılmıştır. Sitenin tercih edilme sebepleri; ara yüzünün kullanım kolaylığı, daha önce benzer çalışmalarda kullanılmış olması (8, 62) ve güncel olmasıdır (son güncelleme tarihi Ekim 2015).

Hem replikon analizi çalışmaları hem de klinik çalışmalar, antiviral sağaltımın başarısızlıkla sonuçlanması ile viral mutasyonlar arasında ilişki olduğunu göstermiştir (27). Çalışmamızda da, protez inhibitörleriyle tedavi alarak KVV sağladığı bilinen NK adlı hastada proteaz inhibitörleri yönünden naif olduğu bilinen dönemde hiç bir ilaç direnci mutasyonuna rastlanmamış olması bu veriyi desteklemektedir.

Çalışmamızda SK1, SA2, NE1 ve NE2 örneklerinde dirençli varyantlara rastlanmıştır. SK1'de 168A, SA2'de 155G ve NE'de 168G varyantları görülmüştür. Literatürde Pİ yönünden naif hastalarla yapılan çalışmalarda, sekanslama yöntemi olarak ister klasik ister yeni nesil kullanılsın hepsinin ortak noktası Pİ yönünden dirençli varyantların sayısının populasyon içinde oldukça az oranda olmasıdır. (81, 2, 18 62, 115). Dirençli varyantların oranı, varyantları analiz etmek için kullanılan yöntemle bağlı olarak %5.7 ile %22 arasında değişmektedir (62). Geno2Pheno websitesi kullanılarak yapılan analizlerde dirençli varyantların oranı %22 (62) bir başka çalışmada ise %19 olarak bulunmuştur (8). Çalışmamızda, literatüre paralel şekilde varyantlar, %21 (14 örnekte 3 varyant) olarak bulunmuştur.

Hasta SK'nın tüm örnekleri için, Pİ yönünden dirençle ilişkilendirilen NS3 bölgesinin 181 a.a'lik kısmında yapılan mutasyon analizinde 31 non-sinonim mutasyona rastlanmıştır. Bu mutasyonların 19'u (%61.2) sadece üçüncü örnekte meydana gelmiştir. İkinci örnekte bulunan ancak sonraki örnekte kaybolan mutasyon sayısı ise sadece 2'dir. Bu hastanın 2. ve 3. örneğinde ortak olarak bulunan mutasyon yoktur. Hastanın anamnezine bakıldığında sağaltımın 8. ayında viral RNA 10 IU/mL olarak saptanmış, sağaltım tamamlandığında (12. ayda) viral yük 147 IU/mL olarak belirlenmiş ve o tarihten (Mayıs 2008), 3. örneğin alındığı Mayıs 2012'ye kadar serumdaki viral yük artmaya devam etmiştir. Sağaltımla hastada bulunan viral popülasyonun büyük ölçüde baskılandığı, 2. örnekle 3. örneğin toplanması arasında geçen 39 aylık sürede viral popülasyonunun yeniden geliştiği söylenebilir.

SK gibi uzun yıllar HCV ile enfekte olan SA hastası incelendiğinde, oluşmuş 41 non-sinonim mutasyonun 12'sinin (%29) sadece 2. örnekte görülüp sonraki örnekte kaybolduğu, 13 (%31)'ünün ise 2. ve 3. örneklerde ortak olduğu bulunmuştur. İkinci örneği sağaltım bitiminden kısa süre sonra (2 ay) alındığı bilinmektedir, 2. örnekte görülen 3. örnekte görülmeyen varyantların, klasik sağaltım etkisiyle oluşan kaçış mutantları olmaları olasıdır. Bu varyantlar replikatif fitnessa sahip olmadıklarından, çalışma içinde 2. ve 3. örnekleri arasında geçen zaman bakımından en uzun süreye (46 ay) sahip olan SA'da silinmiş olabilirler. Bunun yanında hastanın viral yük/zaman grafiği incelendiğinde, viral yükün sadece bir kez

(sağaltımın 9. ayında) düşüş gösterdiği (500 IU/mL), tedavi sonrasında yükselerek birbirine yakın değerlerde devam ettiği görülmektedir. Hastanın epitop korunmuşluk analizinde sırasıyla 1. ve 2. örneklerinde 39 ve 31 epitop korunmuşken 3. örneğinde korunmuş epitop sayısı 28'e düşmüştür. Bu bilgiler ışığında hasta SA'da viral popülasyonun hastanın immün sistemiyle dengeli olarak fikse olmuş olması muhtemel görülmektedir.

Tüm hastalar karaciğer nakli sonrası organ reddini ortadan kaldırmak için bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaç kullanmaktadır. Bu durum immün sistemin virüs üzerindeki seçici baskısını kaldırmakla birlikte, nakil sonrası IFN-RBV sağaltımı viral türümsüleri arttırabilir. Hastaların örnekleri kendi aralarında değerlendirildiğinde NK, MB ve SA'nın en fazla korunmuş epitopa sahip örneklerinin 1. örnek (klasik sağaltım öncesi örnek) olduğu görülmüştür. SK hastasında ise en fazla korunmuş epitopa sahip olan örnek 2. örnektir (klasik sağaltım sonrası örnek). Hastalarda sağaltım öncesi ve sonrası (1. ve 2. örnekler) epitoplarda meydana gelen mutasyonlar klasik sağaltımın viral çeşitliliği arttırdığı görüşünü desteklemektedir. Bunun yanı sıra nakilden sonra klasik sağaltım almayan tek hasta olan NE'nin her iki örneğinde de aynı epitop benzerlik motifinin görülmesi bu görüşü desteklemektedir. Ancak NE kodlu hastanın sadece iki örneği olması ve virüs-immün sistem etkileşiminin oldukça karmaşık olması sebebiyle bunlar ancak öncül fikirlerdir. Literatürde HIV-HCV ko-infekte hastalarla yapılan çalışmalarda, sadece HCV ile enfekte hastaların viral popülasyonlarının ko-infekte hastalardan daha fazla çeşitlilik gösterdiği bulunmuştur (45).

Hem proteaz inhibitörlerine direnç yönünden varyantlar, hem de epitop analizleri incelendiğinde hastaların örnekleri arasında meydana gelen mutasyonların popülasyon içinde çok azının kalıcı olduğu görülmektedir. Hasta MB viral yanıt geliştirdikten bir yıl sonra tekrar enfekte olmuştur. Sekanslama sırasında 3. örneğinde (yeniden enfekte olduktan sonra alınan örneği) zorluklar yaşanmıştır. Üç örneğin ortak korunmuş epitopları (7 epitop) olmasına rağmen, 3. örneğin 1. örnekle ve 3. örneğin 2. örnekle ortak korunmuş epitopu bulunmamaktadır. Hasta MB'ye ait bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, hastanın bir yıl içinde farklı bir kaynaktan

enfekte olma ihtimalini akla getirmektedir. Olası bulaş yolu klasik sağaltımın yan etkisi olan kansızlık nedeniyle yapılan transfüzyonlar olabilir.

Veri tabanlarında ve literatürde, NS3 bölgesinde bilinen CD8⁺ T hücre epitoplarına ilişkin genotip düzeyinde bilgilere ulaşılabilmektedir. HCV genomunda, subtip düzeyinde %15 nükleotit farklılıkları gözlemlendiği bilinmektedir (122). Bu sebeple analiz edilen epitoplar, genotip 1b için de D90208 dizisiyle karşılaştırılarak benzerlikleri araştırılmıştır.

CD8⁺ T hücre epitoplarında meydana gelen mutasyonların, hem erken hem de ilerleyen dönemde bağışıklık sisteminin virüs üzerindeki kontrolünde kritik rol oynadığı bilinmektedir (60). Akut HCV enfeksiyonunda erken, güçlü ve geniş bir sitotoksik T hücre (CTL) yanıtının enfeksiyonun kendi kendine sınırlanması açısından önemli olduğu insan ve şempanzede gösterilmiştir (53, 107). HCV'ye karşı CTL yanıtının koruyucu etkisinin araştırılması için yapılan çalışmada HCV ile sürekli karşılaşanlar sağlıklı bireylerde (mesleki olarak karşılaşanlar veya eşleri HCV taşıyıcısı olanlar) HCV'ye karşı sıvısal bağışık yanıt veya viremi olmaksızın yardımcı T ve CTL yanıtlarında sürekli bir uyarım olduğu bildirilmiştir. Kronik enfeksiyonlarda ise CD8⁺T hücre yanıtlarının genellikle zayıf, az sayıda epitopa yönelik ve işlevsel açıdan(sitotoksikite, sitokin yanıtı, proliferatif yanıt, vb) eksik olduğu bildirilmiştir. Bunun pek çok nedeni olduğu (yetersiz Th yardımı, CD8⁺ hücre farklılaşmasında bozulma, viral faktörler, inhibitör sitokinler ve liganlar ile Treg varlığı) bunlardan birisinin de kaçış mutantları olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (65, 83, 131, 138, 139). Çalışmamızda 68 epitop değerlendirilmiş, 14 serum örneğinden, ikisinde 39(%57,3)'unun korunmuş olduğu, diğer örneklerde ise korunmuşluk oranlarının %57.3-%28 arasında değiştiği saptanmıştır. Örneklerin hiç birinde 39'dan fazla korunmuş epitop bulunmaması, hasta grubunun tüm üyelerinde uzun yıllardır devam eden kronik enfeksiyon sonucu oluşan bağışık yanıtta kaçış mutantlarının varlığıyla açıklanabilir. Yapılan bir çalışmada uzun süreli enfeksiyon sonrası virüsün çevresine adapte olması sonucu replikasyonun arttığı gözlemlenmiştir (120). Buna karşın nakil sonrası hastaların aldığı immünsüpresif tedavi , virüs üzerindeki seçici baskıyı kaldırarak kaçış mutantlarının varlığını azaltmış olabilir. SK kodlu hastanın epitop korunmuşluk analizinde 68 epitoptan 22'sinin (%32.5), hastanın 3 örneğinde de ortak

olması bu sebepten kaynaklanabilir. Karaciğer nakli sonrasında uzun dönemde yapılan çalışmalarda HCV T-hücre epitop dizilerinin büyük ölçüde korunduğu gösterilmiştir (77, 78,110). Bir çalışmada ise nakil sonrasında viral popülasyonun daha homojen hale geldiği gösterilmiştir (84). Bununla birlikte çalışmamızda , nakil öncesine ait örneği olan tek hasta olan NK'nın nakil öncesi örneğinde nakil sonrasına göre daha fazla sayıda korunmuş epitop bulunmuştur.

Hastalardan NK ve SK'da , 1.ve 3. örneklerinde epitoplar korunurken 2. örneklerinde korunmamış epitoplar bulunduğu görülmüştür. HIV ile yapılan çalışmalarda CD8⁺ T hücre epitoplarında meydana gelen mutasyonların viral fitness kaybı ile sonuçlanması nedeniyle eski haline döndüğü belirtilmiştir (30, 39, 68).

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır: 1) Çalışma grubu için seçilen hastalarda spesifik özellikler aranması nedeniyle çalışmaya ancak beş hasta alınabilmiştir, 2) Bu çalışmada kullanılan klasik sekanslama yöntemi, yeni nesil sekanslamaya göre minör viral popülasyonları saptamada daha az hassas bir yöntemdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yeni nesil sekanslama tekniklerinin gelişmesiyle düşük frekanslı HCV türümsülerinin karakterize edilmesiyle sağaltım sırasındaki viral dinamiklerin anlaşılması sağlanmaya başlanmıştır. Yine de türümsü popülasyonlarının DEA'lara karşı direnç oluşumundaki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır.

Nakil sonrası dönemde viral genomda meydana gelen değişimlerin anlaşılması HCV'nin yeni karaciğer dokusuna adapte olma mekanizmasının ve adaptasyonunun, yeni enfeksiyonun şiddeti üzerine etkisinin anlaşılmasına yardımcı olabilir.

Gelecek çalışmalarda T hücre epitoplarnın korunmuşluk analizinin yanında, konak HLA tipinin de belirlenmesi kişiye özel ilaç rejimlerinin belirlenmesi için önemli veriler sağlayabilir.

Proteaz inhibitörleriyle tedaviye başlanmadan önce proteaz inhibitörleri yönünden dirençli varyantların varlığının araştırılması karaciğer nakil hastaları gibi durumları kronik HCV enfeksiyonlu hastalara görece daha hassas olan hasta grubunda, üçlü tedavinin başarısını belirlemede yardımcı olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Ali S, Leveque V, Le Pogam S, ve ark. Selected replicon variants with low level in vitro resistance to the hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitor PSI6130 lack cross-resistance with R1479. *Antimicrob. Agents Chemother* 2008; 52: 4356–4369
2. Alves R, Queiroz AT, Pessoa MG, da Silva EF, ve ark. The presence of resistance mutations to protease and polymerase inhibitors in Hepatitis C virus sequences from the Los Alamos databank. *J Viral Hepat* 2013;20(6):414-21
3. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, ve ark. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology* 2011;8:161
4. Asselah T, Boyer N, Saadoun D, Martinot-Peignoux M, Marcellin P. Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. *Liver Int.* 2016;36 Suppl 1:47-57
5. Bae A, Sun SC, Qi X, Chen X, ve ark. Susceptibility of treatment-naive hepatitis C virus (HCV) clinical isolates to HCV protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(12):5288-5297
6. Barnard RJ, Howe JA, Ogert RA, Zeuzem S ve ark. Analysis of boceprevir resistance associated amino acid variants (RAVs) in two phase 3 boceprevir clinical studies. *Virology.* 2013;444(1-2):329-336
7. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000;81:1631-1648
8. Besse B, Coste-Burel M, Bourgeois N, Feray C, ve ark. Genotyping and resistance profile of hepatitis C (HCV) genotypes 1-6 by sequencing the NS3 protease region using a single optimized sensitive method. *J Virol Methods.* 2012;185(1):94-100
9. Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, ve ark. Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *J Virol* 2005; 79: 3969–3978
10. Chayama K, Notsumata K, Kurosaki M, Sato K, ve ark. Randomized trial of interferon- and ribavirin-free Imlitasvir/paritaprevir/ritonavir in treatment-experienced hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 2015; 61(5):1523-32

11. Chen SL TR Morgan. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *International Journal of Medical Science* 2006;3(2): 47-52
12. Cheng PL, Chang MH, Chao CH, Lee YH. Hepatitis C viral proteins interact with Smad3 and differentially regulate TGF-beta/Smad3-mediated transcriptional activation. *Oncogene* 2004; 23: 7821–7838
13. Chinnadurai R, Velazquez V, Grakoui A. Hepatic transplant and HCV: a new playground for an old virus. *Am J Transplant* 2012;12: 298-305
14. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral genome. *Science* 1989; 244: 359-362
15. Chou R, Clark EC, Holfand M. Screening for hepatitis C virus infection: a review of the evidence for the US Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2004; 140: 465-479
16. Cubero M, Esteban JI, Otero T, Sauleda S, et al. Naturally occurring NS3-protease-inhibitor resistant mutant A156T in the liver of an untreated chronic hepatitis C patient. *Virology* 2008; 370: 237–245
17. Day CL, Lauer GM, Robbins G., McGovern B, et al. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection, *J. Virol* 2002;76:12584–12595
18. de Carvalho IM, Alves R, de Souza PA, da Silva EF, et al. Protease inhibitor resistance mutations in untreated Brazilian patients infected with HCV: novel insights about targeted genotyping approaches. *J Med Virol* 2014;86(10):1714-1721
19. Demetris AJ. Evolution of hepatitis C virus in liver allografts. *Liver Transpl* 2009;15:35-41
20. Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M, Nomura-Takigawa Y, Ikeda M et al. NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J Gen Virol* 2006; 87: 1703–1713
21. Descamps V, Op de Beeck A, Plassart C, et al. Strong correlation between liver and serum levels of hepatitis C virus core antigen and RNA in chronically infected patients. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 465-468

22. Dixit NM, Perelson AS. The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:832-842
23. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, ve ark. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995; 96:224-230
24. Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T ve ark. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(26):15394–15399
25. Farci P. New insights into the HCV quasispecies and compartmentalization. *Semin Liver Dis* 2011;31: 356-374
26. Flint M, McKeating JA. The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Rev Med Virol* 2000;10:101–117
27. Flint M, Mullen S, Deatly AM, Chen W, ve ark. Selection and characterization of hepatitis C virus replicons dually resistant to the polymerase and protease inhibitors HCV-796 and boceprevir (SCH503034). *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(2):401-11
28. Frese M, Schwärzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Haller O, Bartenschlager R. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 2002;35(3):694-703
29. Frick DN. The hepatitis C virus NS3 protein: a model RNA helicase and potential drug target. *Curr Issues Mol Biol* 2007;9(1):1-20
30. Friedrich TC, Dodds EJ, Yant LJ, Vojnov L, ve ark. Reversion of CTL escape-variant immunodeficiency viruses in vivo. *Nat Med* 2004;10(3):275-81
31. Gale MJ Jr, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, ve ark. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997; 230: 217-227
32. Germani G, Tsochatzis E, Papastergiou V, Burroughs AK. HCV in liver transplantation. *Semin Immunopathol* 2012;35(1):101-110

33. Gerber L, Welzel TM, Zeuzem S. New therapeutic strategies in HCV: polymerase inhibitors. *Liver Int* 2013;33(Suppl 1):85-92
34. Gerlach JT, Ulsenheimer A, Grüner NH, Jung MC, ve ark. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J Virol* 2005;79(19):12425-12433.
35. Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolde HM ve ark. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C, *J. Infect Dis* 2000;181:1528–1536.
36. Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol* 2011;55(1):192-206
37. He Y, King MS, Kempf DJ, Lu L, ve ark. Relative replication capacity and selective advantage profiles of protease inhibitor-resistant hepatitis C virus (HCV) NS3 protease mutants in the HCV genotype 1b replicon system. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(3):1101-1110
38. Herbeck JT, Nickle DC, Learn GH, Gottlieb GS, ve ark. Human immunodeficiency virus type 1 env evolves toward ancestral states upon transmission to a new host. *J Virol.* 2006;80(4):1637-44
39. Hoffman B, Liu Q. Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals. *Liver Int* 2011;1449-1467
40. Hoffmann L, Ramos JA, Souza EV, Araújo Ramos AL, ve ark Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study. *Virol J* 2013;10:57
41. Horner SM, Gale MJ. Intracellular Innate Immune Cascades and Interferon Defenses That Control Hepatitis C Virus. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29(9):489-498
42. Howe AY, Black S, Curry S, Ludmerer SW, ve ark. Virologic resistance analysis from a phase 2 study of MK-5172 combined with pegylated interferon/ribavirin in treatment-naive patients with hepatitis C virus genotype 1 infection. *Clin Infect Dis* 2014; 59(12):1657-1665
43. <http://hcv.genopheno.org> (31.01.2016 tarihinde ulaşılmıştır.)

44. <http://hcv.lanl.gov> (12.10.2015 tarihinde ulaşılmıştır.)
45. http://tools.ieadb.org/tools/conservancy/ieadb_input (11.01.2016 tarihinde ulaşılmıştır.)
46. Jabara CB, Hu F, Mollan KR, Williford SE, ve ark. Hepatitis C Virus (HCV) NS3 sequence diversity and antiviral resistance-associated variant frequency in HCV/HIV coinfection. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(10):6079-92
47. Jensen SB, Serre SB, Humes DG, Ramirez S, ve ark. Substitutions at Hepatitis C Virus Genotypes 2-6 NS3 Residues 155, 156, or 168 Induce Complex Patterns of Protease Inhibitor Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*.2015:Epub
48. Johnson Y, Lau N, Robert C. Tam T, ve ark. Mechanism of Action of Ribavirin in the Combination Treatment of Chronic HCV Infection. *Hepatology* 2002;35:1002-1009
49. Ito K, Shiraki K, Funatsuki K, Ishiko H, Sugimoto K et al. Identification of novel hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte epitope in NS3 region. *Hepatology* 2006; 36: 294–300
50. Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, ve ark. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *Journal of Biol Chem* 2006; 281(48): 36560-36568
51. Kamal SM, Acute Hepatitis C: A Systematic Review. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(5): 1283-1297
52. Kaplan DE, Sugimoto K, Newton K, Valiga ME, ve ark. Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 2007;132:654–666.
53. Kato H, Takeuchi o, Sato S, Yoneyama M, ve ark. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441(7089): 101-105
54. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143:1–20
55. Kieffer TL, Kwong AD, Picchio GR. Viral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-Cs). *J Antimicrob Chemother* 2010;65(2):202-212

56. Kieffer TL, De Meyer S, Bartels DJ, Sullivan JC, ve ark. Hepatitis C viral evolution in genotype 1 treatment-naïve and treatment-experienced patients receiving telaprevir-based therapy in clinical trials. *PLoS One* 2012; 7(4):e34372
57. Koonin EV. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive stranded RNA viruses. *J Gen Virol* 1991;72:2197-2206
58. Krishnan P, Schnell G, Tripathi R, Beyer J, ve ark. Analysis of HCV Genotype 1b Resistance Variants in Japanese Patients Treated with Paritaprevir/Ritonavir and Ombitasvir. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec 7. Epub
59. Kuiken C, Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Biol*. 2009;510:33-53
60. Kuntzen T, Timm J, Berical A, Lewis-Ximenez LL, ve ark. Viral sequence evolution in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007;81(21):11658-11668
61. Lagacé L, White PW, Bousquet C, Dansereau N, ve ark. In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3 protease inhibitor BI 201335. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(1):569-572
62. Larrat S, Vallet S, David-Tchouda S, Caporossi A, ve ark. Naturally Occurring Resistance-Associated Variants of Hepatitis C Virus Protease Inhibitors in Poor Responders to Pegylated Interferon-Ribavirin. *J Clin Microbiol* 2015;53(7):2195-202
63. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Jang SJ, ve ark. Hepatitis C virus quasispecies in patients infected with HIV-1: correlation with extrahepatic viral replication. *Virology* 1998;248:164–171
64. Lau JY, Tam RC, Liang TJ, Hong Z. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology* 2002;35(5):1002-1009.
65. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, ve ark. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191(9):1499-512
66. Lenz O, Verbinnen T, Lin TI, Vijgen L, ve ark. In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(5):1878-1887

67. Lenz O, Vijgen L, Berke JM, Cummings MD, ve ark. Virologic response and characterisation of HCV genotype 2-6 in patients receiving TMC435 monotherapy (study TMC435-C202). *J Hepatol.* 2013; 58(3):445-451
68. Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, Draenert R, ve ark. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* 2004;10(3):282-289
69. Li H, Sullivan DG, Feuerborn N, McArdle S, ve ark. Genetic diversity of hepatitis C virus predicts recurrent disease after liver transplantation. *Virology* 2010;5:402(2):248-55
70. Lin C, Lin K, Luong YP, Rao BG, ve ark. In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J Biol Chem* 2004; 279(17):17508-17514
71. Lin C, Gates CA, Rao BG, Brennan DL, ve ark. In vitro studies of cross-resistance mutations against two hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061. *J Biol Chem* 2005; 280(44):36784-36791
72. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005; 436: 933-938
73. Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, ve ark. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Nat Acad Sci U. S. A* 2004;101:10149–10154
74. Malcolm M J, Irish D, Bridge S, Garcia-Diaz A, ve ark. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 2000;181:1528–1536
75. Macartney MJ, Irish D, Bridge SH, Garcia-Diaz A, ve ark. Telaprevir or boceprevir based therapy for chronic hepatitis C infection: development of resistance-associated variants in treatment failure. *Antiviral Res* 2014;105:112-117
76. Machida K, Cheng KT, Lai CK, Jeng KS, ve ark. Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J Virol* 2006; 80: 7199–7207

77. Massaguer A, Ramírez S, Carrión JA, González P, ve ark. Evolution of the NS3 and NS5B regions of the hepatitis C virus during disease recurrence after liver transplantation. *Am J Transplant* 2007;7(9):2172-2179
78. Mello IM, Thumann C, Schvoerer E, Soulier E, ve ark. Conservation of hepatitis C virus nonstructural protein 3 amino acid sequence in viral isolates during liver transplantation. *J Viral Hepat* 2009;16(10):732-737
79. McPhee F, Sheaffer AK, Friberg J, Hernandez D, ve ark. Preclinical Profile and Characterization of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor Asunaprevir (BMS-650032). *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(10):5387-5396
80. Myrnel H, Ulvestad E, Asjo B. The hepatitis C virus enigma. *APMIS* 2009; 117: 427–439
81. Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, ve ark. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus in association with antiviral therapy determined by ultra-deep sequencing. *PLoS One* 2011;6:e24907
82. Navas S, Martin J, Quiroga JA, Castillo I, ve ark. Genetic diversity and tissue compartmentalization of the hepatitis C virus genome in blood mononuclear cells, liver, and serum from chronic hepatitis C patients. *J Virol* 1998;72:1640–1646
83. Neuman MG, Benhamou JP, Bourliere M, Ibrahim A, ve ark. Serum tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta levels in chronic hepatitis C patients are immunomodulated by therapy. *Cytokine* 2002; 17: 108–117
84. Ohtsuru S, Ueda Y, Marusawa H, Inuzuka T, ve ark. Dynamics of defective hepatitis C virus clones in reinfected liver grafts in liver transplant recipients: ultradeep sequencing analysis. *J Clin Microbiol* 2013;51(11):3645-3652
85. Ogert RA, Howe JA, Vierling JM, Kwo PY, ve ark. Resistance-associated amino acid variants associated with boceprevir plus pegylated interferon- α 2b and ribavirin in patients with chronic hepatitis C in the SPRINT-1 trial. *Antivir Ther.* 2013;18(3):387-97
86. Pal S, Sullivan DG, Kim S, Lai K ve ark. Productive replication of hepatitis C virus in perihepatic lymph nodes in vivo: implications of HCV lymphotropism. *Gastroenterology* 2006;130:1107–1116

87. Pan Q, Tilanus HW, Metselaar HJ, Janssen HL, ve ark. Virus-druginteractions-molecular insight into immunosuppression and HCV. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012 ;9(6):355-62
88. Pascu M, Martus P, Höhne M, Wiedenmann B, ve ark. Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut* 2004;53: 1345-1351
89. Pawlotsky J. M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004;12(2): 96-102
90. Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007;132(5):1979-98.
91. Pawlotsky J M. New Antiviral Agents for Hepatitis C. *F1000 Biol Rep* 2012a;4:5
92. Pawlotsky J M, Najera I, Jacobson I. Resistance to mericitabine, a nucleoside analogue inhibitor of HCV RNA-dependent RNA polymerase. *Antivir Ther* 2012b;17, 411–423
93. Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E. Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naïve patients. *Arch Virol* 2010;155(5):807-811
94. Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, Schürmann P ve ark. Rapid induction of virus neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2007;104:6025–6030
95. Pilot-Matias T, Tripathi R, Cohen D, Gaultier I, ve ark. In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor ABT-450. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(2):988-97
96. Ploss A, Dubuisson J. New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut* 2012; 61(Suppl 1): i25-i35
97. Pockros P. Nucleoside/nucleotide analogue polymerase inhibitors in development. *Clin Liver Dis* 2013; 17: 123–128
98. Poveda E, Soriano V. Drug resistance testing in hepatitis C therapy. *Future Virol* 2012; 7: 1–13

99. Poveda E, García F, Telaprevir resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31 (Suppl 3): 26–32
100. Poveda E, Wyles DL, Mena A, Pedreira JD, ve ark. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. *Antiviral Res* 2014;108:181-91.
101. Radkowski M, Wilkinson J, Nowicki M, Adair D, ve ark. Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis of viral sequences in the central nervous system: evidence of replication. *J Virol* 2002;76:600–608
102. Rajyaguru S, Xu S, Hebner C, Svarovskaia E, Gontcharova V, Doehle B, Miller, M, Mo H. 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 :739
103. Rao X, Hoof I, van Baarle D, Keşmir C, ve ark. HLA Preferences for Conserved Epitopes: A Potential Mechanism for Hepatitis C Clearance. *Front Immunol* 2015;6:552
104. Roque Afonso AM, Jiang J, Penin F, Tareau C, ve ark. Nonrandom distribution of hepatitis C virus quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cell subsets. *J Virol* 1999;73:9213–9221.
105. Roque-Afonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G, Kara R, ve ark. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 2005;79:6349–6357
106. Reesink HW, Fanning GC, Farha KA, Weegink C, ve ark. Rapid HCV-RNA decline with once daily TMC435: a phase I study in healthy volunteers and hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2010;138(3):913-921
107. Rehermann, B, M Nascimbeni, Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews. Immunology* 2005; 5(3): 215-229
108. Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest.* 2009 Jul;119(7):1745-54.
109. Roche B, Samuel D. Hepatitis C virus treatment pre-and post-liver transplantation. *Liver Int* 2012;32: 120-128

110. Rosen HR, Marousek G, Chou S. A longitudinal analysis of T-cell epitope-coding regions of hepatitis C virus after liver transplantation. *Transplantation* 2002;27:74(2):209-216
111. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, ve ark. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 2008; 454:523–527.
112. Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, ve ark. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 2007;132(5):1767-77
113. Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010;138(2):447-62
114. Sarrazin C, Vermehren J, New HCV therapies on the horizon. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011; 17: 122–134
115. Sato M, Maekawa S, Komatsu N, Tatsumi A, ve ark. Deep sequencing and phylogenetic analysis of variants resistant to interferon-based protease inhibitor therapy in chronic hepatitis induced by genotype 1b hepatitis C virus. *J Virol* 2015 ;89(11):6105-6116
116. Schneider MD, Sarrazin C. Antiviral therapy of hepatitis C in 2014: Do we need resistance testing? *Antiviral Res* 2014;105:67-71
117. Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, Kim AY, ve ark. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 2005;175(6):3603-3613
118. Seifert U, Liermann H, Racanelli V, Halenius A, ve ark. Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest* 2004;114:250-259
119. Sharma SD. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res* 2010; 131: 17-34
120. Sheldon J, Beach NM, Moreno E, Gallego I, ve ark. Increased replicative fitness can lead to decreased drug sensitivity of hepatitis C virus. *J Virol* 2014;88(20):12098-12111

121. Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Cabezon T ve ark. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 1996;223(2): 409–412
122. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G ve ark. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42: 962-973
123. Sklan EH, Charuworn P, Pang PS, Glenn JS. Mechanisms of HCV survival in the host. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;6(4):217-27
124. Soriano V, Vispo E, Poveda E, Labarga P, ve ark. Directly acting antivirals against hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(8):1673-1686
125. Soriano V, Vispo E, de Mendoza C, ve ark. Hepatitis C therapy with HCV NS5B polymerase inhibitors. *Expert Opin Pharmacother* .2012. 14, 1161–1170.
126. Sullivan DG, Bruden D, Deubner H, McArdle S, ve ark. Hepatitis C virus dynamics during natural infection are associated with long-term histological outcome of chronic hepatitis C disease. *J Infect Dis* 2007;196(2):239-48
127. Susser S, Welsch C, Wang Y, Zettler M, ve ark. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 2009;50(6):1709-18
128. Susser S, Schelhorn S, Lange C, ve ark. Ultratiefe Pyrosequenz-Analyse (UDPS) von neu beschriebenen seltenen Resistenzvarianten der Hepatitis C Virus NS3 Protease bei Patienten, die mit Telaprevir oder Boceprevir behandelt wurden. *Z Gastroenterol* 2012; 50.
129. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, ve ark. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2007;411-423
130. Tang H, Grise H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci* 2009; 117: 49-65
131. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, ve ark. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med*. 2001;19;194(10):1395-406

132. Tillmann H.L, McHutchison. Hepatitis C, In: Boyer T.D, Manns M.P, Sanyal A.J, editors. *Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease*, sixth edition, Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012.p.581
133. Tong X, Chase R, Skelton A, Chen T, ve ark. Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Res* 2006;70:28-38
134. Tong X, Bogen S, Chase R, Girijavallabhan V, ve ark. Characterization of resistance mutations against HCV ketoamide protease inhibitors. *Antiviral Res.* 2008, 77(3):177-85
135. Tsai SL, Chen YM, Chen MH, Huang CY ve ark. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 1998; 115(4): 954–965
136. Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, ve ark. Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol* 2002;76(24):12423-12434
137. Urbani S, Amadei B, Fiscaro P, Tola D, ve ark. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 2006;44(1):126-39
138. Vargas HE, Laskus T, Radkowski M, Wilkinson J, ve ark. recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transpl* 2002;8:1014–1019
139. Vermehren J, Sarrazin C. The role of resistance in HCV treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012;26(4):487-503
140. Wang GP, Sherrill-Mix SA, Chang KM, Quince C, ve ark. Hepatitis C virus transmission bottlenecks analyzed by deep sequencing. *J Virol* 2010;84: 6218-6228
141. Wang XH, Netski DM, Astemborski J, Mehta SH ve ark. Progression of fibrosis during chronic hepatitis C is associated with rapid virus evolution. *J Virol* 2007;81(12): 6513–6522
142. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, ve ark. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection, *J. Immunol.* 169 2002) 3447–3458.







143. Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, Crawford K ve ark. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(7): 2755–2759
144. Welsch C, Jesudian A, Zeuzem S, Jacobson I. New direct-acting antiviral agents for the treatment of hepatitis C virus infection and perspectives. *Gut* 2012; 61 (Suppl 1):i36-i46
145. World Health Organization. Hepatitis C- global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec* 1999; 74: 425–426
146. Zeuzem S, Berg T, Moeller B, Hinrichsen H, ve ark. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2009;16(2):75-90
147. Zhou Y, Bartels DJ, Hanzelka BL, Müh U, ve ark. Phenotypic characterization of resistant Val36 variants of hepatitis C virus NS3-4A serine protease. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(1):110-120
148. Zibert A, Kraas W, Meisel H, Jung G ve ark. Epitope mapping of antibodies directed against hypervariable region 1 in acute self-limiting and chronic infections due to hepatitis C virus. *J Virol* 1997;71:4123-4127
149. Zignego AL, Craxi A. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2008;12:611–636

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/29-03	Tarih: 13.09.2012
	Prof.Dr.A.Arzu SAYINI'ın sorumlusu olduğu "Peg-İnterferon + Ribavirin Tedavisi Başarısız HCV Genotip 1 ile Enfekte Karaciğer TransplantAlıncılarında Tedavi Öncesi ve Sonrasında Viral Genomda Ortaya Çıkan Mutasyonların İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmamın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
CALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyî Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVLURAL (Başkan)	Tabii Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEÜ Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOGMANGÖLLÜ	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Eee BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Huseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji B.D)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	DEÜ İktisadi İktisat Fakültesi Hukuk Bölümü Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. No'lu Özel İlköğretim Okulu Müdür Yard.	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

8.2. Özgeçmiş

ÇAĞLA ÇİFTÇİ

TC Kimlik No / Pasaport No:	15619046912
Doğum Yılı:	1988
Yazışma Adresi :	131 SOK. NO:28/30 D.4 HATAY/İZMİR
Telefon :	0554 947 18 24
Faks :	
e-posta :	cagla.ciftci@ogr.deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
T.C	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2011
T.C	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	2016

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
GENMAR Teşhis Ürünleri	Türkiye	İzmir	AR-GE	Uygulama Uzmanı	02.2015-10.2015

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Mikrobiyoloji, Viroloji

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
<input type="checkbox"/>	Araştırma Bursu	FEMS (Federation of European Microbiological Societies)	2013
	Yedinci Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Poster 3.'lük ödülü	Ankara Mikrobiyoloji Derneği	2012

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Kaya Ö, Duran A, Çiftçi Ç, Kayman T, Sayiner A.A, Abacıoğlu H. HCV Genotiplerinin epidemiyolojisinde değişiklik var mı? Yedinci Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Program ve Bildiri Özet Kitabı: s85, 5-8 Haziran, 2012, Ankara, Türkiye.(Poster)

Çağla Çiftçi, Alessandra Lo Presti, Eleonora Cella , Alessia Lai , Gianguglielmo Zehender Hakan Abacıoğlu , Massimo Ciccozzi. Different Origins of HCV Genotype 4 Infection. EMBO Workshop on Human RNA Viruses jointly sponsored by the ICGEB American Hospital, Özet Kitabı:s22, 6-8 Ekim,2014, İstanbul, Türkiye.(Poster)

Çağla Çiftçi, Alessandra Lo Presti, Eleonora Cella , Alessia Lai , Gianguglielmo Zehender Hakan Abacıoğlu, Massimo Ciccozzi. Türkiye'de HCV Genotip 4a ve 4d'nin Kökenleri. XXXV. Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi, Özet Kitabı:s398-399, 12-16 Kasım,2014, Antalya, Türkiye.
(Sözlü Bildiri)

8.3 İzinler

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İzni



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI




BİRİM / BÖLÜM : TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
SAYI : 445

04.09.2012

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ETİK KURUL BAŞKANLIĞINA

Anabilim Dalımızda görev yapmakta olan Prof.Dr.Arzu SAYINER'in yürütücüsü olduğu "Peg-İnterferon + Ribavirin tedavisi başarısız HCV genotip 1 ile enfekte karaciğer transplant alıcılarında tedavi öncesi ve sonrasında viral genomda ortaya çıkan mutasyonların incelenmesi" isimli proje çalışmalarında Anabilim Dalımız laboratuvarlarının kullanılmasında sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Prof.Dr.İ.Hakkı BAHAR
Anabilim Dalı Başkanı

Alt bilgi

