

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNTERFERON+RİBAVİRİN TEDAVİSİNE VİROLOJİK
YANITSIZ KRONİK HEPATİT C HASTALARINDA
GENOTİP 1b VİRÜS GENOMUNUN İNTERFERONA
HASSASİYETİ BELİRLEYİCİ (ISDR) DİZİSİNDE
MUTASYONLARIN BELİRLENMESİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

NEVİM AYGÜN

132321

132321

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYELERİ

Prof.Dr. Orhan Terzioğlu

Prof.Dr. Hakan Abacıoğlu

İZMİR

2003

20-06-2003


Jüri Başkanı

Prof.Dr. Orhan Terzioğlu

DEÜTF-Tıp Fak.Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Hakan Abacıoğlu

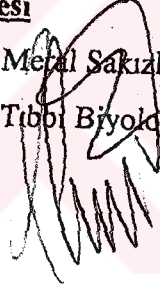
DEÜTF-Mik.ve Klinik Mik.ABD



Jüri Üyesi

Prof.Dr. Metin Sakızlı

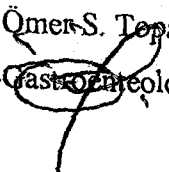
DEÜTF-Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD



Jüri Üyesi

Doç.Dr. Ömer S. Topalak

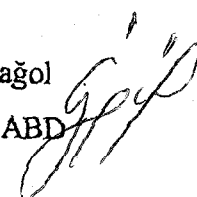
DEÜTF-Gastroenteroloji Bilim Dalı



Jüri Üyesi

Doç.Dr. Özgül Sağol

DEÜTF-Patoloji ABD



TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim ve bu tez çalışması süresince bana destek veren danışmanlarım Prof.Dr. Orhan Terzioğlu ve Prof .Dr.Hakan Abacıoğlu'na çok teşekkür ederim. Ayrıca Anabilim dalı başkanımız Prof.Dr. Meral Sakızlı'ya, Prof.Dr. Neşe Atabey'e ve diğer öğretim üyesi hocalarıma destek ve ilgilerinden dolayı çok teşekkür ederim. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD'da birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma bana her konuda verdikleri destekten ötürü çok teşekkür ederim. Ayrıca benim yüksek lisans eğitimime başlamaya karar vermemde beni yüreklendiren, desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Nuran Yuluğ'a teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmama değerli katkılarından dolayı Doç.Dr.Ömer S.Topalak'a ve Doç.Dr. Özgül Sağol'a çok teşekkür ederim.

Sevgili aileme, hayatım boyunca bana verdikleri sevgi ve destekten dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Sevgilerle.....

Nevim Aygün

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TABLO LİSTESİ.....	I
ŞEKİL LİSTESİ.....	II
KISALTMALAR.....	III
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1 Tarihçe.....	7
4.2 Hepatit C virüsünün moleküler biyolojik özellikleri.....	15
4.2.1 Virüsün genom yapısı.....	15
4.2.2 Klinik özellikler.....	19
4.2.3 Virüs replikasyonu.....	19
4.2.4 HCV'ye immün yanıtlar.....	22
4.2.4.1 Humoral ve hücrel immün yanıtlar.....	22
4.2.4.2 HCV enfeksiyonunda PKR enziminin fonksiyonu.....	24
4.2.5 HCV enfeksiyonunun tedavisi.....	26
4.2.5.1 IFN α 'nın etki mekanizması.....	27
4.2.6 Virüsün epidemiyolojisi.....	29
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	31

5.1 Gereç.....	31
5.1.1 Çalışma grubu.....	31
5.1.2 Hasta gruplarının oluşumu.....	32
5.1.2.1 Yanıtların sınıflandırılması.....	32
5.1.2.2 ISDR tipinin sınıflandırılması.....	32
5.2 Yöntem.....	34
5.2.1 RNA elde edilmesi.....	34
5.2.1.1 Solüsyonların hazırlanması.....	34
5.2.1.2 RNA eldesi.....	35
5.2.2 RT-PCR ile cDNA elde edilmesi.....	36
5.2.2.1 Malzemelerin hazırlanması.....	36
5.2.2.2 cDNA eldesi.....	37
5.2.3 Nested PCR reaksiyonu.....	38
5.2.3.1 Malzemelerin hazırlanması.....	38
5.2.3.1.1 Primerlerin baz dizisi.....	38
5.2.3.2 1. PCR reaksiyonu ile amplifikasyon.....	39
5.2.3.3 2. PCR reaksiyonu ile amplifikasyon.....	40
5.2.4 PCR ürününün agaroz jel elektroforezi.....	41
5.2.4.1 Çözeltilerin hazırlanması.....	41
5.2.4.2 Agaroz jel elektroforezinin uygulanması.....	41
5.2.5 PCR ürünlerinin dizilendirilmesi.....	42
5.2.5.1 Primerlerin baz dizisi.....	42
5.2.6 İstatistiksel analiz.....	42
6. BULGULAR.....	43
7. TARTIŞMA.....	55

8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
9. KAYNAK LİSTESİ.....	63
10. EK: Gönüllü bilgilendirilmiş onay formu.....	82



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1: Majör hepatit virüslerinin genel özellikleri.....	9
Tablo 2: Kronik HCV hastalarının laboratuvar test sonuçları ve tedavi yanıtları.....	33
Tablo 3: RT-PCR reaksiyon karışımı.....	37
Tablo 4: 1.PCR reaksiyon karışımı.....	39
Tablo 5: 2.PCR reaksiyon karışımı.....	40
Tablo 6: Hasta gruplarının ISDR tiplerine göre yüzdesel dağılımları.....	53
Tablo 7: 19 hastanın bazı klinik ve virolojik özellikleri.....	54



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: HCV genomunun yapısı.....	15
Şekil 2: HCV'nin öngörülen yaşam döngüsü.....	21
Şekil 3: PKR aracılıklı eIF2 α fosforilasyonunun mekanizması.....	25
Şekil 4: IFN α 'nın sinyal iletim yolu.....	28
Şekil 5: 1-19 nolu hastalara ait PCR ürünlerinin agaroz jeli fotoğrafları.....	43
Şekil 6: HCV1 nolu hastanın DNA dizisi.....	44
Şekil 7: HCV(5-8) nolu BYL grubu hastalarında ISDR (2209-2248) bölgesinin aminoasit değişimleri.....	46
Şekil 8: HCV9 ve 10 nolu TYS grubu hastalarında ISDR (2209-2248) bölgesinin aminoasit değişimleri.....	47
Şekil 9: HCV1-5 ve 16 nolu hastaların karboksi terminal (2248-2274) bölgesinde yer alan aminoasit değişimleri.....	48
Şekil 10: HCV(7-9) nolu hastaların karboksi terminal (2248-2274) bölgesinde yer alan aminoasit değişimleri.....	49
Şekil 11: HCV(6,10-15) nolu hastaların karboksi terminal (2248-2274) bölgesinde yer alan aminoasit değişimleri.....	50
Şekil 12: HCV(17-19) nolu hastaların karboksi terminal (2248-2274) bölgesinde yer alan aminoasit değişimleri.....	51
Şekil 13: HCV PKR-bağlanma bölgesinin (2209-2274) DNA dizi analizinin sonucunda belirlenen aminoasit dizileri.....	52

KISALTMALAR

- ABD** : Amerika Birleşik Devletleri
- ALT** : Alanin aminotransferaz
- BYL** : Biyokimyasal Yanıtlı
- C** : Core, Kor.
- cDNA**: Complementer DNA
- CN** : Confluent Nekroz
- CTL** : Cytotoxic T Lymphocytes, Sitotoksik T Lenfositler
- DASP** : Dış Antisense Primer
- dATP** : Deoxyadenosine Triphosphate
- dCTP** : Deoxycytidine Triphosphate
- DEPc** : Dietilpirokarbonat
- dGTP** : Deoxyguanosine Triphosphate
- DNA** : Deoksiribonükleik Asit
- dNTP** : Deoxynucleoside Triphosphate
- dsDNA**: Double stranded DNA, çift iplikli DNA
- DSP** : Dış Sense Primer
- dsRNA**: Double stranded-RNA, çift iplikli RNA
- dTTP** : Deoxythymidine Triphosphate
- EDTA** : Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
- EIA** : Enzim Immun Assay, Enzim İmmün Testi
- eIF2 α** : Eukaryotic Initiation Factor 2 α
- eIF2B** : Eukaryotic Initiation Factor 2B
- ELİSA**: Enzym-Linked Immuno Sorbent Assay
- ER** : Endoplazmik Retikulum
- EtBr** : Etidyum Bromür
- ET-NANBH**: Enterically Transmitted-Non A, Non B Hepatitis, Bağırsak Yoluyla Bulaşan non A, non B Hepatit
- GBV-A**: GB virüs-A
- GBV-B**: GB virüs-B
- GBV-C**: GB virüs-C

- HAA** : Hepatitis Associated Antigen, Hepatitle Birleşmiş Antijen
- HAI** : Histology Activity Index
- HAV** : Hepatit A Virüs
- HbcAg**: Hepatit B Core Antigen, Hepatit B Kor Antijen
- HbeAg**: Hepatitis B e Antigen, Hepatit B e Antijen
- HbsAg**: Hepatitis B surface Antigen, Hepatit B yüzey Antijeni
- HBV** : Hepatit B Virüs
- HCC** : Hepatocellular Carcinoma, Karaciğer Kanseri
- HCL** : Hidroklorik asit
- HCV** : Hepatit C Virüs
- HDV** : Hepatit D Virüs
- HEV** : Hepatit E Virüs
- HGV** : Hepatit G Virüs
- HIV** : Human Immunodeficiency Virus, İnsan İmmün-yetmezlik Virüsü
- HVR-1**: Hypervariable region-1, Yüksek oranda değişken bölge-1
- HVRs**: Hypervariable regions, Yüksek oranda değişken bölgeler
- ICTV** : International Committee on Taxonomy of Viruses
- IFN** : İnterferon
- IFNAR**: İnterferon Alfa Reseptör
- IL** : İnterleukin
- IRES** : Internal Ribosome Entry Site
- ISDR** : İnterferon Sensitivity Determining Region, İnterferona Hassasiyeti Belirleyici Bölge
- ISGF3**: İnterferon Stimule Gen Faktör 3
- ISGs** : İnterferon Stimule Genler
- ISRE** : İnterferon Stimulated Response Element
- İASP** : Inner Antisense Primer
- İSP** : Inner Sense Primer
- JAK** : Janus Kinase
- LDLs** : Low Density Lipoproteins, Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
- MgCl**: Magnezyum Klorür
- mRNA**: Messenger RNA

- MS-1** : Mir serum-1
- MS-2** : Mir serum-2
- MuMLV**: Moloney Murine Leukemia Virus
- NaCl** : Sodyum Klorür
- NANBH**: Non A, Non B Hepatit
- NaOAc** : Sodyum Asetat
- NaOH** : Sodyum hidroksit
- 5'NCR** : 5'Non-Coding Region
- NIH** : National Institute of Health, Ulusal Sağlık Enstitüsü
- NK** : Natural Killer
- NS** : Non-structural, Yapısal olmayan
- NTPase**: Nucleotide Triphosphatase, Nükleotid Trifosfataz
- 2-5 OAS**: 2, 5-oligoadenylate synthetase
- ORF** : Open Reading Frame, Açık Okuma Çerçevesi
- PBMC** : Peripheral Blood Mononuclear Cell, Periferel Kan Mononükleer Hücreler
- PI** : Portal İnflamasyon
- PKR** : Double Stranded RNA-Activated Protein Kinase, Çift İplikli RNA'nın Aktive Ettiği Protein Kinaz
- PN** : Piecemeal Nekroz
- PTB** : Polypyrimidine-Tract-Binding Protein, Polipirimidin Alanı Bağlanma Proteini
- PTH** : Post-transfüzyonal Hepatit
- RdRp** : RNA dependent RNA polimerase, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz
- RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism, Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizm
- RIBA** : Rekombinant Immunoblot Assay
- RNA** : Ribonükleik Asit
- RT-PCR**: Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction, Tersine Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- SDS** : Sodyum Dodesil Sülfat
- SN** : Spotty Nekroz
- SOD** : Süperoksit Dismutaz
- ssRNA** : Single stranded RNA, tek iplikli RNA

- STAT1** : Signal Transducers and Activators of Transcription 1
STAT2 : Signal Transducers and Activators of Transcription 2
STD : Sexually Transmitted Diseases, Seksüel Geçişli Hastalıklar
Taq DNA: Thermophilus Aquaticus DNA
TBE : Tris-Borikasıit-EDTA
Th1 : T-helper 1
Th2 : T-helper 2
TNE : Tris, NaCl, EDTA
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TYL : Tam Yanıtlı
TYS : Tam Yanıtsız
5'UTR : 5'Untranslated Region
WHO : World Health Organization, Dünya Sağlık Örgütü



1. ÖZET

“İnterferon+Ribavirin tedavisine virolojik yanıtı kronik hepatit C hastalarında, genotip1b virüs genomunun interferona hassasiyeti belirleyici (ISDR) dizisinde mutasyonların belirlenmesi”

Dünyada 170 milyon insanı etkileyen Hepatit C Virüs (HCV) enfeksiyonu; %50 -85 kronikleşmeye, bunların % 20'sinde siroz gelişimine ve her yıl 3.5-10 milyon sirozluda karaciğer kanseri görülme riskine yolaçar. AntiHCV pozitifliği, dünyada ortalama % 3, Türkiye'de farklı kaynaklara göre % 0.3-4'tür. Ayrıca Türkiye'de kronik karaciğer hastalıklarında, HCV prevalansı % 13-27'dir. Kronik HCV enfeksiyonunda uygulanan tedavilerin başarısızlığındaki etkili mekanizmaların saptanması ve hastalığın etkin tedavi protokollerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Uluslararası kronik HCV tedavisi için IFN+Ribavirin kullanımında başarı ile ilgili olarak, “çift iplikli RNA'nın aktive ettiği protein kinaz” (double stranded RNA activated protein kinase, PKR) bağlanma alanının etkinliği yayınlandı. HCV'nin non-structural 5A (NS5A) geninden kodlanan ve PKR-bağlanma alanını kapsayan NS5A proteini, PKR enzimine bağlanarak dimerize olmasına engel olmakta ve hücre ölümünü önlemektedir. Bu durumda virüs üremesine devam etmektedir. NS5A-PKR bağlanma alanında saptanan bazı mutasyonların, in vivo mayada PKR enzimine bağlanmayı önleyerek hücrelerin ölmesine neden olduğu ve virüsün üremesini engellediği gösterildi.

Dokuz Eylül Üniversitesi hastanesinde IFN+Ribavirin tedavisi alan, HCV genotip1b üç tam yanıtı (TYL), beş biyokimyasal yanıtı (BYL), 11 tam yanıtı (TYS) hastaya ait serum örnekleri çalışıldı. Her bir serumdan proteinaz K yöntemiyle RNA izolasyonu, RT-PCR ile cDNA eldesi ve bu ürünlerden nested PCR ile HCV-NS5A (PKR bağlanma alanını kodlayan bölge) geni amplifiye edilerek DNA dizisi belirlendi. Sonuçta; 86 aminoasit değişiminin 14 (% 16)'ü PKR-bağlanma alanının kapsadığı ISDR bölgesinde, 72 (% 84) 'si bu bölgenin karboksi terminal alanında saptandı. ISDR'nin 14 aminoasit değişiminin 12 (% 86) 'si BYL grubunda belirlendi. BYL hasta grubunda ISDR aminoasit değişimi sayısı, TYS hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fazla bulundu ($p=0.012$). Bu araştırma; genotip 1b kronik HCV hastalarının IFN+Ribavirin tedavisinde, biyokimyasal yanıt açısından ISDR aminoasit değişimlerinin, önemli bir prediktör faktör olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Kronik HCV, genotip 1b, IFN+Ribavirin, PKR-bağlanma alanı, ISDR

2. SUMMARY

“Identification of mutations within the sequence of interferon sensitivity determining region (ISDR) of virus genotype 1b in chronic hepatitis C patients who are virologically nonresponsive to IFN+Ribavirin therapy”

Hepatitis C Virus (HCV) infection which affects 170 million people in the world, carries a risk of chronicity in up to 50-85 % and developing cirrhosis in 20 % of patients. Among the latter about 3.5-10 million of them have an increased risk of hepatocellular carcinoma. AntiHCV positivity is approximately 3 % in the world and 0.3-4 % in Turkey according to different resources. Besides, prevalence of HCV in chronic liver diseases is 13-27 % in Turkey. Identifying the mechanisms that lead to therapy failure in chronic HCV infection and improvement of effective therapy protocols are required.

“Double stranded RNA activated protein kinase” binding region (PKR-binding region) was reported to be effective in IFN+Ribavirin treatment for international chronic HCV therapies. NS5A protein encoded from the HCV genome nonstructural 5A (NS5A) gene has a PKR-binding region that blocks the dimerization of PKR, resulting in the prevention of cell death and continuation of virus proliferation. Some of the mutations in this region are shown to prevent PKR enzyme binding and virus proliferation and thus lead to cell death in yeast.

In this study, sera samples from three complete responders (CR), five biochemical responders (BR) and 11 nonresponders (NR) that were infected by genotype 1b HCV and received IFN+Ribavirin therapy in Dokuz Eylul University Hospital were studied. HCV-NS5A (coding PKR binding region) gene was amplified through RNA extraction, RT-PCR and nested PCR and the PCR products were sequenced for mutation analysis. Finally, 86 aminoacid mutations were detected, 14 (16 %) of them were within the ISDR and 72 (84 %) of them were within the carboxy terminal domain of the protein. 12 (86 %) of 14 aminoacid mutations in the ISDR were detected in the BR group. ISDR aminoacid mutation number in BR patient group is statistically more significant than that in the NR patient group ($p=0.012$). According to this study, ISDR aminoacid mutations are important predictor factors for biochemical responses in IFN+Ribavirin therapy of genotype 1b infected chronic HCV patients.

Key Words: Chronic HCV, genotype 1b, IFN+Ribavirin, PKR-binding region, ISDR

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit C Virüs (HCV) enfeksiyonu, dünyada 170 milyon insanın etkilendiği önemli bir sağlık sorunudur. Dünya sağlık örgütünün (World Health Organization,WHO) açıkladığı verilere göre, genel popülasyonda HCV antikor pozitifliği ortalama % 3' tür(1). Türkiye' de HCV seroprevalansı, farklı kaynaklara göre % 0.3-4 arasında değişmektedir(2-5). HCV yaygınlığının, özellikle bazı hasta gruplarında daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. 1993 yılında Avrupa Diyaliz ve Transplant derneği, Türkiye' de hemodiyaliz ve organ transplantasyon hastalarında HCV yaygınlığını % 17.7 olarak açıklamıştır. Türk Nefroloji derneği aynı hasta gruplarında HCV prevalansının; 1996, 1997 ve 1998 yıllarında sırasıyla % 38, % 52.6 ve % 63.2' ye yükseldiğini rapor etti(6).

HCV, % 50-85 kronikleşme oranı ile kronik karaciğer hastalıklarının da önemli sebeplerinden biridir(7). Türkiye' de yapılan araştırmalara göre, kronik karaciğer hastalıklarında HCV prevalansı % 13-27 arasında değişmektedir(8,9). Kronik HCV enfeksiyonu görülen hastaların % 20' sinde siroz, siroz görülen olguların da yıl başına % 3-7.8' inde karaciğer kanseri (hepatocellular carcinoma, HCC) gelişim riski bulunmaktadır(7,10,11). Siroz ve HCC gelişim riski ile birlikte Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) HCV kaynaklı karaciğer hastalığı nedeniyle her yıl 8.000-10.000 kişinin öldüğünün açıklanması, enfeksiyonun ciddi boyutlarını ortaya koymaktadır(12). Ayrıca ülkemizde ve dünyada oluşan bu klinik tablo, HCV ile mücadelede etkili bir tedavi yöntemi ya da aşı geliştirilmesinin ne denli önemli olduğunu göstermektedir.

Şu anda HCV enfeksiyonunu önlemek amacıyla interferon (IFN)+Ribavirin tedavisi yaygın olarak uygulanmaktadır. Ancak hastaların kalıcı yanıt verme oranları, %30-40 arasındadır (13). Tedaviye yanıtta; yaş, cinsiyet, alanin aminotransferaz (ALT) düzeyi, viral yük ve virüs genotipi gibi klinik ve virolojik faktörler önemlidir. Çalışmalarda özellikle virüs genotiplerinin tedavi yanıtlarına olan etkisi araştırılmaktadır(14,15).

HCV'ye karşı savunmada etkin bir tedavi şu ana kadar uygulanamadığı gibi koruyucu bir aşı da geliştirilememiştir. HCV genomunun yüksek mutasyon hızı ile ortaya çıkan kompleks varyantlarının (quasispecies) varlığı, aşı geliştirmeye karşı önemli bir engel oluşturmak-

tadır. Ayrıca bu konudaki çabalar, HCV nin hücre kültür sistemlerinde yeterince etkin olarak üretilmemesinden dolayı sonuçsuz kalmaktadır(16).

HCV esas olarak karaciğerde replike olan, hepatotropik bir virüstür. HCV hastalarının ve deneysel olarak enfekte edilmiş şempanzelerin hepatositlerinde virüse ait ribonükleik asit (RNA) ve proteinlerin bulunması, karaciğer tropismi için güçlü bir kanıttır(17-20). Bununla birlikte HCV replikasyonunun karaciğer dışında kemik iliği, lenf nodları, dalak, pankreas, tiroid ve adrenal bezler, periferel kan mononükleer hücreler (peripheral blood mononuclear cell , PBMC) ve primer biliyer epitel hücrelerinde de meydana geldiği rapor edilmiştir(21-23).

HCV başlıca parenteral yollarla bulaşır. Enfeksiyonun bulaş kaynakları arasında; taranmayan kan ya da kan ürünleri, damar içi ilaç kullanımı, enjektör iğnesi kazaları, hastanın bakımı sırasında kontamine enstruman kullanımı ve dövme salonları yer almaktadır(12). HCV ye karşı etkin bir tedavinin ve aşının yokluğunda, enfeksiyonun bulaşmasını önlemek şu anda en iyi çözüm olarak görünmekte ve dolayısıyla yukarıda bahsedilen bulaş kaynaklarının kontrol edilmesi için çaba sarfedilmesi gerekmektedir. Ayrıca HCV nin özgüllüğü ve hassasiyeti yüksek testlerle serum ya da plazmada tanımlanması, parenteral yollarla virüsün yayılmasını engelleyecektir. Bu amaç doğrultusunda, HCV nin klonlandığı 1989 yılından bugüne kadar virüse karşı oluşan antikoları saptayan birçok serolojik tanı testleri uygulamaya girmiştir(24).

İlk test; 1989 yılında moleküler biyolojik tekniklerle, HCV genomunun yapısal olmayan 4A (nonstructural 4A, NS4A) bölgesine ait 5-1-1 ve 81 adı verilen klonlar elde edildiğinde geliştirilmiştir. Öncelikle bu klonlardan yararlanılarak oluşturulan açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF), insan süperoksit dismutaz (SOD) geni ile birlikte mayada eksprese edilmiştir. C100-3 adı verilen bu ekspresyon ürünü kanda HCV antikolarının belirlenmesinde kullanılmıştır(25). 1990 yılında C100-3 antijenine spesifik antikoları saptayan 1.kuşak anti-HCV enzim-linked immuno sorbent assay (Elisa) testi ile kan ve kan ürünlerinin taranmasına başlanmıştır(26). 1992 yılında c100-3 antijenine ek olarak kor (core, C) ve NS3 gen bölgesi antijenlerine karşı oluşan antikoları saptayan 2.kuşak anti-HCV Elisa testi lisans almıştır(26). 1994 yılında core, NS3 ve NS5 gen bölgesi antijenlerine karşı oluşan antikoları saptayan 3. kuşak HCV antikor testleri kullanıma girmiştir(27,28).

Ayrıca anti-HCV Elisa pozitif sonuçların doğrulanması amacıyla; 1., 2. ve 3. kuşak rekombinant immünoelaz testi (RIBA) testleride geliştirilmiştir(26,27). RIBA testi ile nitrosetilaz bir strip üzerinde bulunan HCV proteinlerine özgül antikorlar tespit edilmektedir. RIBA testi sonucunun belirsiz ya da negatif çıkması durumunda, kalitatif HCV-RNA tayininin yapılması önerilmektedir. Kalitatif HCV-RNA tayini ile serum ya da plazmada virüs replikasyonunun gösterilmesi amaçlanmaktadır. Tersine transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (reverse transcriptase polimerase chain reaction, RT-PCR), kalitatif HCV-RNA tayini için yaygın olarak kullanılmaktadır(29). Serum ya da plazmada kantitatif olarak virüs yükünün saptanması da mümkündür. RT-PCR ile sinyal amplifikasyonu temelinde dayalı branched deoksiribonükleik asit (DNA) probe testi, viral yükün ölçülmesinde sıkça kullanılan kantitatif HCV-RNA testleridir(29). Kanda kalitatif ve kantitatif HCV-RNA tayini, klinik tedavide hastalığın gelişiminin değerlendirilmesinde ve antiviral tedavi protokolünün düzenlenmesinde çok önemlidir.

Klinik tedavinin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer önemli test virüs genotiplendirmedir. Genotipleme için çoğunlukla E1, core, NS5 ya da 5' non-coding region (5' NCR) bölgelerinden en az birinin DNA dizi analizi yapılmaktadır. Ayrıca restriksiyon fragman uzunluk polimorfizm (restriction fragment length polymorphism, RFLP), tipe özgül primerler ile amplifikasyon, tipe özgül probe ile hibridizasyon yöntemleri de kullanılabilir(29).

HCV'nin şu ana kadar tanımlanmış, 6 majör genotipi ve 70'den fazla subtipi bulunmaktadır(30). Yapılan çalışmalarda HCV genotiplerinin, kronik hepatit C hastalarının IFN tedavisine yanıt hızlarında farklılıklar meydana getirdiği gösterilmiştir(14,15). Araştırmalarda genellikle, HCV genotip 2 ve 3 (% 65) ile enfekte olan hastaların genotip 1 (% 30) ile enfekte olanlara göre, kalıcı yanıt hızlarının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Özellikle virüs genomunun NS5A geni içinde bulunan "İnterferon hassasiyeti belirleyici bölgesi" (Interferon Sensitivity Determining Region, ISDR)'nin değişkenliğinin IFN tedavisine yanıtta etkili olduğu düşünülmektedir. İn vivo mayada, HCV NS5A proteininin ISDR yoluyla, hücresel savunma mekanizmasında önemli bir enzim olan "çift iplikli RNA'nın aktive ettiği protein kinaza" (double stranded RNA activated protein kinase, PKR) bağlanarak inhibe ettiğinin gösterilmesi, bu düşüncüyü desteklemektedir(31). Ancak bu konuda yapılan araştırmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Japonya ve İspanya'da yapılan çalışmalarda; HCV genotip 1b'nin ISDR bölgesinde bulunan aminoasit değişimlerinin sayısı ile IFN tedavisine alınan yanıt-

ların ilişkili olduğu bildirilmiştir(32-36). ABD ve bazı Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda ise böyle bir ilişki saptanamamıştır(37-42).

Yine in vivo bir çalışmada, HCV NS5A proteininin PKR-bağlanma alanı içinde, ISDR'nin yanısıra 26 aminoasitlik karboksi terminal bölgesinde yer aldığı rapor edilmiştir(43). Bu yüzden çalışmalarda, ISDR'nin karboksi terminalinde bulunan aminoasit değişimleri ile IFN tedavisi yanıtları arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Japonya'da yapılan böyle bir araştırmada genotip 1b subtipinde, PKR-bağlanma alanı içinde bulunan karboksi terminal bölgede meydana gelen aminoasit değişimlerinin sayısının, devam eden virolojik yanıtı hastalarda geçici yanıtı hasta grubuna göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir(33).

Bu bağlamda ülkemizde yapılan araştırmalarda, HCV genotip 1b'nin yaygınlığı rapor edilmiş ancak ISDR ve karboksi terminal bölgeyi kapsayan PKR-bağlanma alanındaki aminoasit dizisi değişkenliğiyle, uygulanan IFN tedavisi yanıtları arasındaki ilişkiyi gösteren bir veri henüz yayınlanmamıştır(44).

Bu çalışmada; kronik HCV hastalarında, IFN α +Ribavirin tedavisi yanıtları ile HCV genotip 1b suşunun PKR-bağlanma alanı aminoasit dizisi değişimleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, IFN α +Ribavirin kombine tedavisi alan genotip 1b kronik HCV hastalarında, viral poliproteininin 2209. ve 2248. kodonları arasında yeralan ISDR ve 2248. ve 2274. kodonları arasında bulunan karboksi terminal bölgelerinin DNA dizi analizi gerçekleştirildi. Elde edilen DNA dizileri, uluslar arası kabul edilen HCVJ consensus dizisi ile karşılaştırıldı ve mutasyonlar ile protein dizisinde yolaçtığı aminosit farklılıkları belirlendi. Araştırmada kullanılan yöntem, uluslar arası standartlara uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışmada elde ettiğimiz verilerin, kronik HCV hastalarının tedavisinin yönlendirilmesine yardımcı olması ve uluslar arası literatüre katkıda bulunması beklenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Tarihçe

Cockayne E.A.'ya göre, eski Yunanistan ve Roma'da sarılık bilinmekteydi(45). Epidemik sarılığın ilk tanımı, Milattan önce beşinci yüzyılda Hipokrat tarafından yapılmıştır(46). Tarih boyunca sarılık salgınlarının meydana geldiği görülmektedir. Özellikle de 19. ve 20. yüzyıllarda yapılan savaşlarda yaygın olduğu rapor edildi(46). Hastalığın bilimsel olarak ilk tanımını, 1865 yılında patoloji profesörü Virchow R. yapmış ve sarılığın sporadik formuna kataral ikter adını vermiştir(47). Kan ya da kan ürünleriyle sarılığın bulaşıcılığı ilk kez, 1883 yılında Bremen çiçek aşısı kampanyası sırasında, Lurman A. tarafından belgelendi. Kampanyada insan lenfinden hazırlanan aşı ile aşılanan tersane işçilerinin %15'inde sarılık bulguları gözlemlenmiştir(46).

1900'lerin başında hekimler; sarılığın, kişiden kişiye temas, besin ve olasılıkla su ile bulaştığı konusunda hemfikirler. Bir çok hekim sarılığın yayılmasında, damlacık yolu enfeksiyonunun daha etkin olduğunu düşünürken, ABD'li ve Avrupalı bazı araştırmacılar, gastrointestinal geçişi tahmin ediyorlardı(45). 1908 yılında MacDonald S., epidemik sarılığın sebebinin bir virüsle ilgili olduğunu yayınlamıştır(45). 1912 yılında Cockayne E.A., epidemik ve kataral sarılığın, sebebi bilinmeyen bir başka hastalık kabakulak ile benzer özellikler taşıdığını gözlemlemiş ve hastalığa spesifik bir organizmanın neden olduğu sonucunu çıkarmıştır. MacDonald S.'in gözlemine benzer olarak yayında yazar, epidemik ve kataral sarılıkta, aktif kalan bir virülant şarttan söz etmektedir(45). 1931 yılında Findlay GM., Dunlop JL. ve Brown HC.'nin yayınladıkları incelemelerinde, epidemik sarılığa varicella, herpes zoster, rubella ve deng'e benzeyen ultra-mikroskopik bir virüsün yol açabileceği belirtilmiştir. Araştırmacılar-dan Brown HC.'nin, Yorkshire'da meydana gelen sarılık salgınından etkilenen bir kişinin serum örneği ile temasından sonra, sarılık belirtileri gösterdiği rapor edildi.

1942 yılında sarılığın bulaşıcılığını belgeleyen gönüllü denemelerinin ilki, Almanya'da Voegt tarafından başlatılmıştır. Deneylerde, ozaman enfeksiyöz hepatit adı verilen kısa inkübasyonlu sarılığın, oral yolla gönüllü insanlara bulaştırıldığı rapor edildi(45). 1943 yılında bu kez Cameron JDS., sarılıklı hastaların serum ya da kan örneklerini gönüllülere enjekte ederek enfeksiyöz hepatitin bulaşıcılığını gözlemlediğini açıklamıştır(45). Yine 1943 yılında Beeson

P.B. tarafından ABD` de, ilk kez kan ya da plazmanın transfüzyonu sonrası gelişen post transfüzyonal hepatit (PTH) rapor edildi(26). 1944 yılında Havens ve meslektaşları, serum ya da dışkı ekstraktı süzıntüsünün oral yolla verilmesinden sonra, bazı gönüllülerde kısa inkübasyonlu enfeksiyöz hepatiti gözlemlemişlerdir. Aynı grup, deri içine serum aşıl原因an gönüllülerde de, o zaman serum hepatiti adı verilen uzun inkübasyonlu sarılık belirtilerini rapor ettiler(45).

Enfeksiyöz ve serum hepatitinin epidemiyolojisinin farklılığı ortadaydı. Ayrıca yapılan gönüllü çalışmaları sonucunda, enfeksiyöz ve serum hepatitin viral sebebe dayandığına dair kanıtlar sağlanmıştı. Bunun üzerine 1947 yılında MacCallum ve Bauer, enfeksiyöz hepatitin hepatit A, serum hepatitin hepatit B olarak isimlendirilmesini önerdiler(46). Bu öneriyi dünya sağlık örgütü 1973 yılında onaylamıştır(48).

Sonuç olarak hepatit A'nın fekal-oral yolla bulaştığı, 2-6 haftalık inkübasyon periyodunun bulunduğu ve çocuklarda yaygın olduğu ortaya konmuştur. Hepatit B'nin kan ürünlerinin deriye enjeksiyonu (parenteral) ile bulaştığı, 2-6 aylık inkübasyon süresinin bulunduğu ve yetişkinlerde daha sık görüldüğü belirlenmiştir(46).

1963 yılında Blumberg B.S. ve Alter H.J., Avustralya'da yaşayan lösemili Aborijin hastasının serumunda tanımladıkları immunopresipitine, Avustralya antijeni adını verdiler(49). 1966 yılında Blumberg B.S. ve çalışma arkadaşları, akut viral hepatitle Avustralya antijenini ilişkili bulduklarını rapor ettiler(50). 1967 yılında Krugman S. ve meslektaşları, hepatit virüsünün 2 farklı tipini kesin olarak tanımlamışlardır. Willowbrook zeka özürlüleri okulunda endemik olarak bulunan hepatitin kontrolü için yapılan çalışmalarda, hepatit geçiren Mir adında bir öğrencinin hastalığının iki atağı sırasında alınan serum örneklerinden, Mir serum 1 (MS-1) ve Mir serum 2 (MS-2) havuzları oluşturuldu. Çalışmada, MS-1 ve MS-2 serum örneklerinin diğer öğrencilere aşılmasıyla hepatitin bulaştığı görülmüştür. MS-1 bulaştırılan bazı öğrencilerde kısa inkübasyonlu hepatit gözlemlenirken, MS-2 bulaştırılan öğrencilerin bir grubunda uzun inkübasyonlu hepatiti tanımlamışlardır(45). O zamandan günümüze kadar birçok hepatit virüsü tanımlanmıştır. Tablo 1`de tanımlanan majör hepatit virüslerinin genel özellikleri görülmektedir.

Tablo 1: Majör Hepatit Virüslerinin Genel Özellikleri

ss RNA(+): single stranded RNA(+), ds DNA: double stranded DNA, ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses.

Virüs Adı	Virüsün Keşfi	İlk Sınıflandırma	Son Sınıflandırma	Virüs Genomu	Zarflı	Yayılma
Hepatit A (HAV)	1973'de dışkıda immün elektron mikroskobu ile keşfedildi.	1983'de Pikonavirüs Enterovirüs	Picornaviridae Hepatovirüs (ICTV-2002)	ss RNA(+)	Zarfsız	Fekal-Oral
Hepatit B (HBV)	1963'de virüse ait Avustralya antijeni tanımlandı.	1986'da Hepadnaviridae	Hepadnaviridae Orthohepadnavirüs (ICTV-2002)	Parsiyel ds DNA	Zarflı	Parenteral
Hepatit C (HCV)	1988'da virüs izole edildi.	1988'de Togavirüs olarak sınıflandırılması önerildi.	Flaviviridae Hepacivirüs (ICTV-2002)	ss RNA(+)	Zarflı	Parenteral
Hepatit D (HDV)	1977'de kronik HBV'li hastalarda keşfedildi.	1995'de Deltavirüs	Deltavirüs (ICTV-2002)	ss sirküler ve lineer RNA(-)	Zarflı (HBV kaynaklı)	Parenteral
Hepatit E (HEV)	1983'de immün elektron mikroskobu ile keşfedildi.	1988'de Calicivirüs olarak sınıflandırılması önerildi.	Hepatit-E like virüs (ICTV-2002)	ss RNA(+)	Zarfsız	Fekal-Oral
GBV-A	1995'de tamarinlerde keşfedildi.	1995'de Flaviviridae ailesi içinde sınıflandırılması önerildi.	Unclassified Flaviviridae (ICTV-2002)	ss RNA(+)	Zarflı	İnsanlarda şimdiye kadar enfeksiyon yarattığı saptanmadı.
GBV-B	1995'de tamarinlerde keşfedildi.	1995'de Flaviviridae ailesi içinde sınıflandırılması önerildi.	Unclassified Flaviviridae (ICTV-2002)	ss RNA(+)	Zarflı	İnsanlarda şimdiye kadar enfeksiyon yarattığı saptanmadı.
GBV-C	1995'de kriptogenik hepatit hastalarının serumunda keşfedildi.	1996'da Flaviviridae ailesi içinde sınıflandırılması önerildi.	Unclassified Flaviviridae GBV-C/HGV grubu (ICTV-2002)	ss RNA(+)	Zarflı	Parenteral
Hepatit G (HGV)	1996'da kronik hepatit hastasının plazmasında tanımlandı.	1996'da flaviviridae ailesi içinde sınıflandırılması önerildi.	Unclassified Flaviviridae GBV-C/HGV grubu (ICTV-2002)	ss RNA(+)	Zarflı	Parenteral

1968 yılında Prince A.M., Okochi K ve Murakami S; Avustralya antijenini tip B hepatiti gelişimi ile ilişkili bulduklarını rapor ettiler(51,52). 1970 yılında Dane DS ve meslektaşları; Avustralya antijeni pozitif hepatit hastalarının serum örneklerinde, Dane adı verilen hepatit B virüs (HBV) partiküllerini keşfettiler(53). Çalışmada 42 nm çapındaki partiküllerin, HBV vir-

yonu olduğu, 22nm çapındaki daha küçük yapıların Avustralya antijenini içeren partiküller olduğu hipotez edilmiştir. HBV viryonunun dış yüzeyindeki yapılar Avustralya antijenine benzetilmiştir. Ayrıca, HBV viryonunun nükleokapside benzetilen kor bölgesini (hepatitis B core antigen, HBcAg) tanımlamışlardır.

1970 yılında düzenlenen ulusal sağlık enstitüsü (National Institute of Health, NIH) konferansında, Avustralya antijeninin enfeksiyöz ajanın bir parçası olduğu açıklanmıştır. Enfeksiyöz ajan, hepatit virüsü olarak tahmin ediliyordu(26). 1970 yılında Alter HJ ve meslektaşları kan donörlerinde, Avustralya antijeninin varlığının test edilmesini önerdiler. Avustralya antijeni o zaman hepatitle birleşen antijen (hepatitis-associated antigen, HAA) adıyla anılmaya başlanmıştır. Şu anda Avustralya antijenine, hepatit B yüzey antijeni (hepatitis B surface antigen, HbsAg) adı verilmektedir(54). 1971 yılında kan bağışları HbsAg testi ile taranmaya başlanmıştır. HbsAg`yi bulmaya yönelik ilk metodlar, immünodifüzyon ve counterelektroforezi içeren nispeten hassas olmayan yöntemlerdi(26).1971 yılında Almeida J.D. ve çalışma arkadaşları, HBV partikülünün 27 nm çapında internal komponentini ve antikorunu (Anti-HBcAg) göstermişlerdir(55). 1972 yılında ilk kez Magnus ve Epsmark, hepatit e antijenini (HbeAg) tanımladılar(46). İlk Hepatit B aşısı, 1981 yılında ABD`de lisans almıştır(56). 1986 yılında hepatit B virüsü Hepadnaviridae ailesi içinde sınıflandırılmıştır(57).

Hepatit A` ya sebep olan viral ajan (Hepatit A Virüs, HAV), ilk kez 1973 yılında immün elektron mikroskopik inceleme ile, besin kaynaklı akut hepatit hastalarının dışkı örneklerinde keşfedildi(26). 1974 yılında serum HAV antikorlarının (anti-HAV) bulunması için, immün adherence ve komplement fiksasyon testleri geliştirilmiştir(45). 1983 yılında HAV Pikkornavirus ailesi içinde, Enterovirus olarak sınıflandırılmıştır(26). 1991 yılında Avrupa`da hepatit A aşısı lisans almıştır(56).

1977 yılında ilk kez Rizzetto et.al. tarafından, kronik HBV enfeksiyonu görülen hastalarda hepatit D virüsü (HDV) keşfedildi(58). 1980 yılında şempanze deneyleri sonucunda, delta ajanının, enfeksiyon yaratabilmek için HBV`ye ihtiyacı duyan ayrı bir virüs olduğu tanımlanmıştır(59). HDV virüsü zarf proteinini şifrelememektedir. Hepatit B virüsü; HDV`nin birleşmesi için gerekli olan zarf glikoproteinlerini sağlamaktadır(60). 1985 yılında yapılan bir çalışmada HDV enfeksiyonunun, akut HBV enfeksiyonunda koenfeksiyon ya da kronik HBV taşıyıcılarında süperenfeksiyon oluşturabileceği bildirilmiştir(61). 1989 yılında ilk kez Hershov

ve çalışma arkadaşları ABD`de İllinois eyaletinde, gelişim bozukluğu taşıyan bireyler ile ilgili çalışan bazı kuruluşlarda, HDV`nin yaygınlığını rapor ettiler(62). 1995`de HDV, Delta virüs olarak sınıflandırıldı(63).

Bağırsak yoluyla bulaşan non-A, non-B hepatit (Enterically Transmitted non-A, non-B hepatitis, ET-NANBH) retrospektif bir çalışmayla, enfeksiyöz hepatit olarak ilk kez 1955 yılı Hindistan Yeni Delhi salgınında belgelenmiştir(64). Daha sonra Asya, Afrika ve Kuzey Amerika`da da ET-NANBH salgınları rapor edildi(65). Hastalığa neden olan viral ajan, 1983 yılında Balayan et.al tarafından immün elektron mikroskopisi ile görüntülenmiştir. 1988 yılında Purcell RH. ve Ticehurst JR. tarafından ET-NANBH ajanına, hepatitis E Virüs (HEV) adı verildi. Aynı yıl virüsün elektron mikroskopisi ve diğer özellikleri gözönüne alınarak, HEV`in Calicivirus ailesi içinde sınıflandırılması önerilmiştir. 1991 yılında HEV genomunun tam dizisi rapor edildi(65). 1955 Hindistan Yeni Delhi salgınına yolaçan virüsün HEV olduğu, 1994 yılında retrospektif olarak doğrulanmıştır(66).

1967 yılında ilk kez Deinhardt ve meslektaşları, GB virüs hepatitini keşfettiler . Araştırmacılar önce bilinmeyen bir tür viral hepatit taşıdığı düşünülen hasta serumlarını marmoset maymunlarına aşıladılar ve daha sonra diğer maymunlara pasajladılar. Kullandıkları serumlardan biri, GB (İsminin ve soy isminin ilk harflerini simgeler) adında, akut ikterik hepatit geliştiren bir cerraha aitti. Deneylerde bu cerraha ait serumla pasajlanan hemen hemen tüm maymunlarda, karaciğer enzim düzeylerinin arttığı ve karaciğer biopsilerinde histopatolojiksel değişimler izlendiği rapor edildi. Daha sonra GB hepatit ajanını tanımaya yönelik çalışmalar devam etmiştir(67). Uzunca bir aradan sonra, 1995 yılında Abbott Diagnostics Division araştırmacıları virüs keşif grubu, GB hepatit ajanı ile enfekte tamarinlerden flavivirüs genomuna benzeyen 2 RNA klonu izole ettiler. Klonlanan iki ajana GB virüs A (GBV-A) ve GB virüs B (GBV-B) adını verdiler(68). Aynı yıl, virüs keşif grubu tarafından klonlanan virüslerin genomik organizasyonu açıklandı. Çalışma sonucunda GB ajanlarının Flaviviridae ailesi içinde ayrı bir genusta sınıflandırılması önerilmiştir(69). Daha ileri düzeyde yapılan araştırmalarda, GBV-B`nin tamarinlerde hepatiti indüklediği, GBV-A`nın ise apotajen davrandığı işaret edilmiştir(67). Orijinal GB aşısının insan kaynaklı olmasına rağmen, yüksek riskli hastalarda GBV-A ve GBV-B virüs RNA dizilerinin bulunamaması, bu virüslerin insan kaynaklı olmadıklarını akla getirmektedir(70).

Virüs keşif grubu 1995 yılında, kriptogenik hepatitli hastaların serumunda, GBVA, GBV-B ve HCV'nin içerdiği ortak sekanslardan türetilen primerler ile gen amplifikasyonu sonucu klonladıkları yeni bir GB-virüsü tanımlamışlardır. Bu yeni virüse GB virüs C (GBV-C) adını verdiler(71). 1996 yılında Leary TP., GBV-C'nin poliprotein dizisini belirledi ve genom organizasyonunu açıkladı. Protein sekanslarının belirlenmesinden sonra yapılan filogenetik analizlere göre, GBV-C'nin Flaviviridae ailesi içinde yer alması gerektiği önerilmiştir(72).

GB ajanlarının tanımlanıp karakterize edilmesinden sonra 1996 yılında, Linnen J. ve arkadaşları, kronik hepatitli hastanın plazmasından bir RNA virüsü olan hepatit G virüsü (HGV) 'nü tanımladılar. HGV'nin transfüzyon yoluyla geçebildiği, ABD'de gönüllü kan donörleri popülasyonunda var olduğu açıklanmıştır. Araştırmada HGV'nin; Flaviviridae ailesi içinde sınıflandırılması önerilmiştir. Ayrıca Linnen J HGV ve GBV-C arasında NS3 bölgesinde nükleotid düzeyinde % 85.5, aminoasit düzeyinde %100 özdeşlik tanımlamıştır(73). GBV-C ve HGV arasında tüm viral poliprotein düzeyinde de %95 amino asit özdeşliği gösterilmiştir. Sonuç olarak, 2 izolat aynı virüsün farklı suşları olarak tanımlanarak GBV-C/HGV olarak isimlendirilmiştir(74).

1975 yılına kadar non-A, non-B hepatit (NANBH)'in varlığı bilinmiyordu. PTH hastalarının saklanan kan örneklerine, Hepatit A ve B tanısal testleri uygulandığında hastaların bir bölümünün ne hepatit A ne de hepatit B olmadığı görülmüştür(75). NANBH ajanı, 1978 yılında şempanzelere geçirildiğinde, virüsün zarflı yapıda, 30-60 nm çapında ortalama 7-10 haftalık inkübasyon süresinin olduğu açıklanmıştır(56). 1984 yılında kan alıcılarında, NANBH ile donör antiHBc pozitifliğinin ilişkili olduğu rapor edildi(76). 1986 yılında NANBH gelişiminin, antiHBc (+) kan alıcılarında antiHBc(-) kan alıcılarına göre, yaklaşık 3 kat daha fazla yaygın olduğu bildirildi. Diğer taraftan hepatit B gelişimi açısından, antiHBc (+) ve antiHBc (-) donör kanlarının alıcıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır(77). 1986 yılında ilk kez Hoofnagle, J. tarafından kronik NANBH hastalarında, IFN- α tedavisi denendiğinde bazı hastalarda, ALT konsantrasyonlarının normal sınırlarda devam ettiği rapor edildi(27).

1988 yılında NANBH viral ajanı, Kaliforniya biyoteknoloji şirketi Chiron araştırmacıları Houghton M. ve Bradley DW. tarafından, moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak izole

edildi ve kısmen özellikleri tanımlandı. Virüsün yaklaşık 100.000 nükleotidli tek iplikli RNA genomu içerdiği belirlenerek Togavirüs olarak sınıflandırılması önerilmiştir(78).

1989 yılında Choo QL. ve meslektaşları tarafından planlanan çalışmada, NANBH ajanını içeren şempanze plazmasından, complementer DNA (cDNA) kütüphanesi meydana getirildi. Kronik bir NANBH hastasının serumu ile kütüphanenin viral antijeni eksprese eden klonları tarandığında, NANBH ajanına ait pozitif cDNA klonu 5-1-1 tanımlanmıştır. 5-1-1 klonu aynı cDNA kütüphanesi ile hibridize edildiğinde, 81 adı verilen daha geniş bir klon elde edilmiştir. Sonuç olarak kan kaynaklı NANBH virüsüne, HCV adı verildi(79). 1989 yılında Hepatit C virüsünün NS4A bölgesine ait 5-1-1 ve 81 klonlarından yararlanılarak oluşturulan ORF, mayada insan SOD geni ile birlikte eksprese edilmiştir. C100-3 adı verilen ekspresyon ürününe karşı oluşan antikoları tanıyan spesifik test ile; ABD, İtalya ve Japonya'dan NANBH'li hastaların serum örnekleri taranmıştır. Tarama ile hepatit C virüsünün, kronik NANBH'in major sebebi olduğu anlaşılmıştır(25).

1990 yılında ABD'de, virüsün c100-3 antijenine karşı oluşan antikolara özgül olarak geliştirilen, 1. kuşak HCV enzim immüntesti (HCV1.0 enzim immun assay, HCV1.0 EIA) ile kan donörü taramalarına başlanmıştır(26). Ancak HCV1.0 EIA'nın tüm enfeksiyöz kan örneklerinde HCV antikoları tespitinde, tam olarak başarılı olmadığı açıklanmıştır. Yine de HCV 1.0 EIA ile ABD'de her yıl 40.000 kişiye, HCV geçişinin engellendiği rapor edildi(10).1991 yılında HCV genomunun tüm nükleotid dizisi belirlenmiştir(80). 1992 yılında virüsün c100-3, yapısal c22-3 ve yapısal olmayan c33c antijenlerine karşı oluşan antikolara özgül olarak geliştirilen 2. kuşak HCV 2.0 EIA testi kan donörü taramalarında kullanılmaya başlanmıştır(26). 2.kuşak HCV 2.0 EIA ile tahminen yılda 13.000 kişiye HCV geçişinin engellendiği rapor edildi(10). 1993 yılında ABD'de Chiron RIBA 2.0 doğrulama testi lisans almıştır(26). 1994 yılında Avrupa'da virüsün c22-3, c33c ve NS5 rekombinant proteinlerine karşı oluşan antikolara özgül olarak geliştirilen 3. kuşak HCV 3.0 EIA kullanıma girmiştir. Aynı yıl virüsün NS3, NS5 rekombinant antijenleri ile C ve NS4 gen bölgesinden oluşan sentetik peptidlerini içeren RIBA3.0 testi geliştirildi(27).

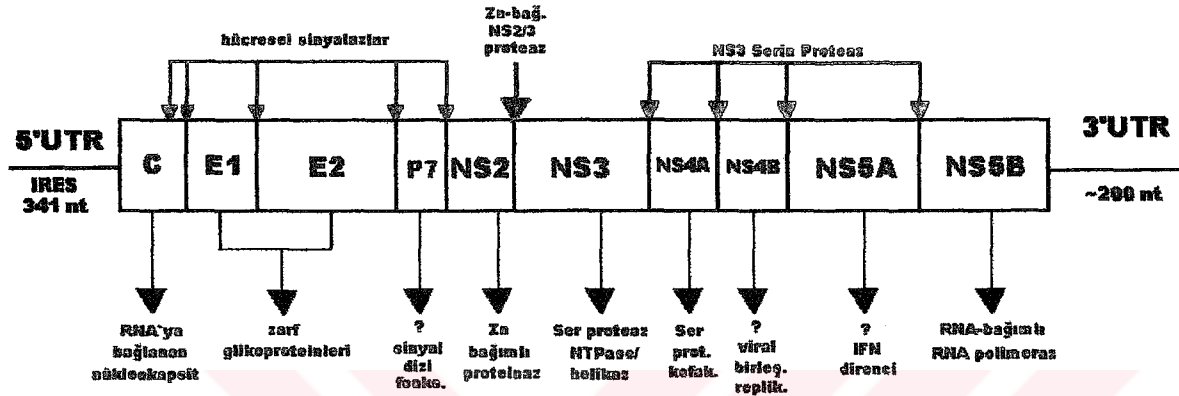
1994 yılında HCV genotip ve subtipleri için ortak bir sınıflandırma sistemi önerilmiştir. Bu sistemde; nükleotid dizi benzerliği dikkate alınarak, HCV 6 majör genotip ve 11 subtipte sınıflandırılmıştır. 6 majör genotip 1'den 6'ya kadar arap rakamlarıyla keşiflerinin sırasına

göre numaralandırıldılar. Aynı genotip içinde birbiriyle dizi benzerliği açısından yakından ilişkili HCV subtipleri, keşfedilme sıralarına göre küçük alfabetik harfler ile 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 4a, 5a, 6a şeklinde sınıflandırıldılar(81). 1995 yılında Japonya`da, IFN α tedavisi alan kronik HCV`li genotip1b enfekte hastalarda, virüs genomunun NS5A geninin 2209. ve 2248. kodonları arasında kalan bölgesi, Enomoto N. ve çalışma arkadaşları tarafından, ISDR bölgesi olarak tanımlanmıştır(82).



4.2 Hepatit C virüsünün moleküler biyolojik özellikleri

4.2.1 Virüsün Genom Yapısı



Şekil 1: HCV genomunun yapısı

HCV; Flaviviridae ailesinin Hepasivirüs genusunda yer almaktadır. 9.5 kb'lık tek iplikli, pozitif yönelimli RNA içeren virüs genomunun ORF'si ile 3,011 amino asitlik bir poliprotein kodlanır(13,24). Her bir genotipin ORF uzunluğunun farklı olduğu görülmektedir. ORF uzunluğu genotip1 izolatlarında yaklaşık 9400 ribonükleotid, genotip2 ile genotip3 izolatlarında sırasıyla 9,099 ve 9,063 ribonükleotid olarak belirlenmiştir(24). Virüsün NS5 bölgesinin 222 bp'lik parçası dikkate alınarak farklı genotiplerin % 55-72, aynı genotip içinde yer alan subtiplerin %75-86 ve özel izolat içinde bulunan kompleks varyantların (quasispecies) % 90.8-99 dizi benzerliği gösterdikleri rapor edildi(13,24).

HCV poliproteini en az 4 yapısal ve 6 yapısal olmayan proteinden oluşmaktadır (Şekil 1). C, zarf (E1,E2) ve p7 yapısal proteinleri; NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B yapısal olmayan proteinleri şifrelemektedir(83,84). Yapısal ve yapısal olmayan proteinler, enfekte hücrenin endoplazmik retikulumunda, hücresel ve viral proteazlarla kotranslasyonel ve post-translasyonel işleme meydana getirilirler(84,85). Poliprotein N-ucunda yer alan C, E1, E2 yapısal proteinleri viral partikül komponentlerini meydana getirirken, yapısal olmayan

proteinler virüsün yaşam döngüsünde özellikle viral genomun replikasyonunda fonksiyon göstermektedirler(86).

C, E1 ve E2 yapısal proteinleri, konakçı hücrenin sinyal peptidazları ile poliproteinden ayrılırlar(87,88). 191 aminoasitten oluşan aminoterminal uca en yakın bulunan C proteininin RNA'ya bağlandığı ve polimerize olduğunun gösterilmesi, viral genomik RNA ile birleşerek nükleokapsiti oluşturduğunu akla getirmektedir. Diğer taraftan C proteininin, konakçı hücrelerin transformasyonunda ve/veya modülasyonunda fonksiyon gösterdiğine inanılmaktadır(85, 89). Viral zarfı oluşturan virüsün diğer iki yapısal glikoproteini E1 ve E2'nin birbirleriyle, kararlı nonkovalent heterodimer bir yapı meydana getirdikleri gösterildi. Bu kararlı E1-E2 heterodimer yapının, HCV'nin konakçı hücreye girmesinde etken olan mekanizmalarda görev aldığı düşünülmektedir(86-88). HCV E2'nin aminoterminal alanında son derece değişken bölge 1 (hypervariable region 1, HVR-1) tanımlanmaktadır. HVR-1'deki dizi değişkenliğinin; HCV'nin konakçı immüniteden kaçmasında ve enfeksiyonun ilerlemesinde etkili olduğu sanılmaktadır(90).

Poliprotein yapısal ve yapısal olmayan proteinleri arasında yer alan p7; 63 aminoasitlik küçük hidrofobik bir polipeptiddir. Son zamanlarda gerçekleştirilen bir çalışmada, HCV p7'nin, C ucunda bulunan bir sinyal dizisiyle endoplazmik retikulum lümeninde, bir haberci proteinin translokasyonunu indükleyebildiği gösterildi. Bu araştırma sonucunda, p7'nin C domaininin sinyal dizi fonksiyonuna sahip olduğu açıklandı(91). p7 ile NS2 proteininin birbirinden ayrılmasının, endoplazmik retikulumda yer alan bir hücrel sinyal peptidazla gerçekleştiği düşünülmektedir(86).

NS2, hidrofobik glikozillenmemiş, enfekte hücrenin membranlarıyla birleşen integral bir membran proteindir. NS2 ile NS3'ün bölünme işlemi üzerine, NS2 kotranslasyonel olarak, endoplazmik retikulum membranına transloke olmaktadır. Delesyon-haritalama çalışmalarına göre; NS2'nin 2 internal sinyal dizisi içerdiği ve çok sayıda transmembran alanı olduğu sonucu çıkarılmaktadır. Hücre kültüründe yapılan bir çalışmada, NS2 delesyonunda HCV replikasyonunun engellenmediği gösterildi. Bu sonuç, NS2'nin HCV replikasyonu için gerekli olmadığını düşündürmektedir(92).

NS2 ve NS3'ün birbirinden ayrılması; NS2 dizisinin büyük bir bölümünün ve NS3'ün proteaz alanının birlikte şifrelediği polipeptidin, otoproteaz aktivitesi sayesinde gerçekleştirilir (93). NS2/NS3 bölünme işleminin, Zn-bağımlı intramoleküler bir reaksiyon ile meydana geldiği önerilmektedir(94). NS3 geni; serin proteaz ve nükleotid trifosfataz (nucleotide triphosphatase, NTPase)/ RNA helikaz aktivitesi gösteren 2 fonksiyonel bölgeyi kapsar. NS3 transmembran alanına sahip olmadığı için NS2' den ayrıldıktan sonra, membran birleşiminde NS4A'ya gereksinim duymaktadır. Endoplazmik retikulum (ER) ya da ER benzeri membranlarla birleşebilmek amacıyla NS3, NS4A'nın merkezi alanına nonkovalent olarak bağlanmaktadır. NS3'ün tek başına eksprese olduğu zaman, sitoplazma ve nükleus boyunca yayılarak dağıldığı rapor edildi(86,95).

NS4A serin proteaz için 54 aminoasitlik bir kofaktördür. NS4A ve NS3 arasında kararlı bir kompleks oluşumu, NS3'ü stabilize etmektedir(86). Bu kompleks oluşumu üzerine; aktive olan NS3-serin proteaz, NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B bölünme noktalarında, viral poliproteini ayırır(83,94). NS3, NS4A ve NS4B'nin; NS5A hiperfosforilasyonunu modüle ettikleri ve NS5B'nin şifrelediği RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RNA dependent RNA polimerase, RdRp) enzimi ile bir kompleks oluşturdukları rapor edildi. Bu etkileşimler, NS3, NS4A, NS4B, NS5B ile birlikte diğer HCV proteinlerinin, viral replikasyon için temel multikompleks bir mekanizmanın içinde yer aldıklarını akla getirmektedir(83). NS4B ER da lokalize olan 27 kDa ağırlığında hidrofobik bir proteindir(83). NS4B'nin viral birleşme ve replikasyonda önemli olabileceği düşünülmektedir(96).

NS5A, serin amino asiti üzerinden farklı derecelerde, hipo ve hiper fosforillenmiş , p56 ve p58 adı verilen 2 formu bulunan bir fosfoproteindir(97,98). Hiperfosforilasyon; NS4A ile NS3 proteazın birlikte hareketiyle, NS5A'nın poliproteinden ayrılmasından sonra meydana gelmektedir(99). Bazı araştırmalarda NS5A'nın; NS4A'ya bağımlı ya da bağımsız olarak, tanımlanamayan bir hücrel kinazla fosforile edildiği rapor edildi(97,98,100-102). Ancak hala fosforilasyonun, NS5A aktivitesindeki rolü izah edilememektedir(13,103). NS5A'nın membran birleşiminin, N terminal ucunda bulunan amfipatik alfa heliks aracılığıyla, diğer viral proteinlerinden bağımsız olarak gerçekleştiği gösterildi(104). NS5A'nın, HCV replikasyonu için önemli olduğu, in vitro adaptiv mutasyonlarla yapılan bir çalışmada rapor edildi(105,106). Fakat NS5A'nın replikasyondaki rolü tam olarak açıklanamamış değildir. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada in vitro olarak NS5A'nın, NS5B RdRp aktivitesinde doza bağımlı inhibitör

etkisi yarattığı yayınlandı. Yayında NS5A'nın, HCV replikasyonu için negatif bir regülatör görevi üstlendiği belirtilmektedir. Bu negatif regülatör etki ile HCV'nin konakçı hücre yanıtını indüklemeyen bazal düzeyde varlığını sürdürmüş olabileceği öne sürülmektedir(107). Diğer taraftan NS5A ile kronik HCV hastalarının IFN tedavisi yanıtlarının ilişkili olduğu rapor edildi(32-36). Özellikle bazı Japon hastalarda, ISDR bölgesinde bulunan yüksek mutasyon sıklığı ile düşük viral RNA titresinin birleşmesi, NS5A'nın HCV replikasyonunda rol oynadığını akla getirmektedir(13).

Poliprotein C terminal bölgesinde yer alan NS5B proteini, HCV genom replikasyonu için temel RdRp aktivitesi gösterir(108). NS5B; palm ve finger yapılarına sahip olan ve korunan 'ABCDEF' motifini barındıran, nükleik asite-bağımlı nükleik asit polimerazların grubunda yer almaktadır(109). Sekonder yapı analizi çalışmaları ile HCV NS5B'nin hidrofobik karboksi uca sahip olduğu gösterildi. HCV replikasyon komplekslerinde yer alan NS5B'nin hidrofobik C ucunun, konakçı hücre membranı ile birleşim için gerekli olduğu rapor edildi(110-112). NS5B; (-) ve (+) iplikli RNA sentezini katalizleyen, anahtar bir enzimdir(113). NS5B'nin, primere bağımlı tarzda ya da copy-back mekanizmayla RNA uzamasını katalizleyebildiği yayınlandı(114).

HCV 5'untranslated region (UTR)'nin kapsadığı, 341 nükleotid uzunluğundaki internal ribosome entry site (IRES); Cap'e bağımlı olmadan HCV ORF'nin translasyonunu başlatmaktadır. 5'UTR HCV RNA replikasyonu için de gereklidir(115). HCV 5'UTR; kök-halka 1, kök-halka 2, kök-halka 3, kök-halka 4'ü içeren 4 ayrı RNA bölgesinden meydana gelmektedir. Kısa kök-halka 1; 5.ve 20. RNA bazları arasındaki dizilerle oluşturulmaktadır. Bu bölgenin, IRES aktivitesi için gerekli olmadığı gösterildi. Kök-halka 1'in bir regülatör rolü olduğu düşünülmektedir. Kök-halka 2'nin IRES fonksiyonu için önemi tartışmalıdır. Çoğu çalışmada bu yapının varlığının translasyonun verimliliğini artırdığı gösterildi. Kök-halka 3, IRES'in kor bölgesini oluşturur ve IRES aktivitesi için önemli RNA pseudoknot oluşumuna katılır. Kök-halka 4; 5'UTR'nin downstream bölgesinin yanısıra kapsid proteininin kodladığı AUG kodonunu ve ilk birkaç nükleotid dizisini de içermektedir(115).

HCV 3'UTR; yaklaşık 200 nükleotid uzunluğunda olup 3 ayrı bölgeden oluşmaktadır. 3' UTR; değişken uzunlukta poli(U/UC) dizileri ile az korunan 27-66 bazlık bir dizi ve yüksek oranda korunan 98 nükleotidlik diziden (X) meydana gelmektedir(116,117). X bölgesinin

kök halka-1, kök halka-2, kök halka-3 adı verilen 3 kararlı kök-halka yapısına katlandığı gösterildi(118). 3'UTR'nin X bölgesinin ve poli(U/UC) dizilerinin in vivo replikasyon için gerekli olduğu yayınlandı(119).

4.2.2 Klinik Özellikler

HCV bulaştıktan 3 hafta sonra, serumda viral RNA bulunabilmekte ve ALT düzeyleri artabilmektedir. Hastaların sadece üçte biri 2-12 hafta süren akut hepatit belirtileri göstermektedir(120). Akut HCV semptomları arasında; sarılık, idrar renginin koyuluğu, sıkıntı, bulantı, karaciğer sağ karın üst dördte birlik bölümünde ağrı şeklinde belirtiler yer almaktadır(121).

Akut hepatit olgularının % 50-85'inde kronik enfeksiyon gelişir(7). Kronik enfeksiyonda genellikle akut hepatit belirtileri görülmez. Bununla birlikte kronik HCV enfeksiyonunda, yorgunluk, eklem ağrısı ve karaciğer sağ karın üst dördte birlik bölümünde rahatsızlık gibi işaretler ortaya çıkabilmektedir(122). Kronik HCV enfeksiyonunda, ALT düzeyleri yüksektir ve HCV RNA pozitifdir. Ancak kronik enfekte hastaların yaklaşık üçte biri normal ALT düzeylerini sürdürürler(120).

HCV; karaciğer dışında gelişen glomerulopati, kriyoglobulinemi, porfiriya cutanea tarda, poliarteritis nodosa, sicca-like sendrom, liken planus ve B hücre nonHodkin's lenfoma gibi lenfoproliferatif bozukluğu içeren hastalıklar ile birlikte görülebilmektedir(10,7). Kronik hepatit taşıyıcı hastaların yaklaşık %20'sinde, siroz görüldüğü rapor edildi(10,7,11). Ayrıca HCV kaynaklı siroz hastalarının % 3-7.8'inde, HCC riskinin bulunduğu yayınlandı(7,11).

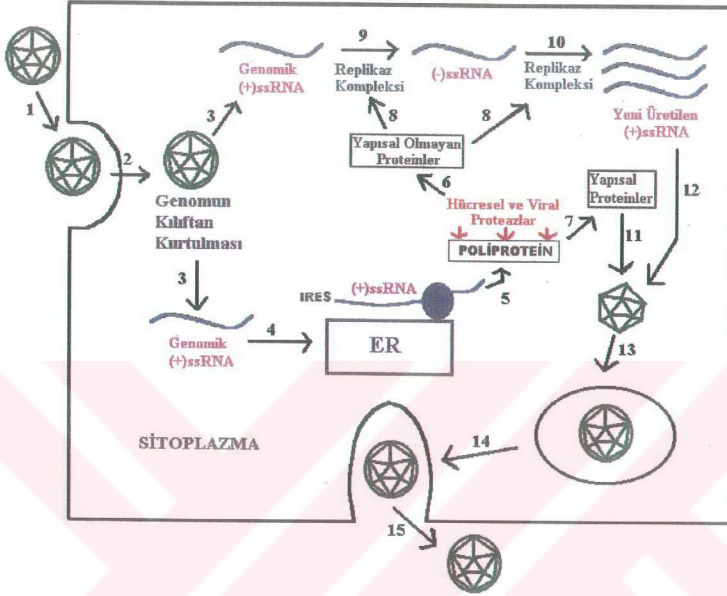
4.2.3 Virüs Replikasyonu

HCV replikasyonu, esas olarak karaciğerde hepatositlerde gerçekleşmektedir(13). Ancak karaciğer dışında, kemik iliği, lenf nodları, dalak, pankreas, tiroid ve adrenal bezler, PBMC'ler, primer biliyer epitel hücreler de de HCV replikasyonunun meydana geldiği gösterildi(21-23). 1978 yılından beri meydana gelen süreçte, HCV replikasyonuna dair bazı bilgilerin elde edilmesinde şempanze modeli kullanıldı. HCV replikasyon döngüsünün anlaşılmasında Flavivirüslerin genel replikasyon şemasından da bazı çıkarımlar yapılmıştır. Ancak yine de HCV replikasyonu tam olarak izah edilememiştir.

İlk olarak Lohman V. 1999'da, replikon teknolojisine dayalı bir HCV replikasyon mo-delini tanımladı(123). Bu model sayesinde, HCV replikaz kompleksinin içerdiği yapısal olma-yan proteinlerinin topolojisinin ve hücresel lokalizasyonunun belirlenmesinde önemli ilerle-meler sağlandı(124). Replikon teknolojisinin esasına göre, ilk önce HCV ile enfekte insan ka-raciğerinden viral RNA izole edilmiştir. İzole edilen viral RNA'dan klonlanan tüm HCV ge-nomu, subgenomik seçilebilir replikonların yapımında kullanılmıştır. Replikon sistemde bisis-tronik RNA'lar; translasyonel kontrolden sorumlu bir IRES, HCV NS-proteinleri, ikinci bir IRES'in kontrolünde seçilebilir bir marker ve yanal dizilerde 3',5' NTR'ler içermektedirler. Subgenomik seçilebilir replikonlar insan hepatoma hücre soyuna transfekte edilmektedir. Bu hücre soyunda, RNA molekülleri HCV NS-proteinlerini eksprese ederek viral RNA'yı replike ederler(124). Replikon sisteminde viral RNA'nın yüksek derecede etkin replikasyon hızı gö-rülebilmektedir. Bu yüzden HCV replikasyon döngüsünün incelenmesinde replikon teknoloji-sinin efektif olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

Şu anda varolan bilgilere göre; HCV replikasyon döngüsünde ilk adım, viral partikülle-rin hücreye yapışması ve virüsün hücre içine reseptör aracılıklı-endositoz ile alınmasıdır (Şekil 2). HCV'nin hücreye alınmasında, iki aday hücresel reseptör tanımlandı. Birincisi, HCV E2 zarf proteini ve virüs partikülleri ile etkileştiği gösterilen CD81'dir. CD81, hepatositler ve B lenfositleri içeren çeşitli hücre tiplerinde eksprese olan bir tetraspanindir(125). Hepatoma ve B hücre lenfoblastoid hücre soylarında, HCV partikülü ile etkileştiği gösterilen ikinci aday, düşük yoğunluklu lipoprotein (Low density lipoproteinler, LDLs) reseptörleridir(126).

Virüsün konakçı hücreye penetrasyonundan sonra genomik RNA, sitoplazmada virüs partikülünden kurtulmaktadır(127). Translasyon başlangıcında, viral genom IRES vasıtasıyla ribozomlara yönlendirilmektedir(113,128,129). HCV IRES, ribozomal 40S'lik altbirime spe-sifik olarak bağlanmaktadır. Bağlanma için, ayrıca translasyon faktörlerinin gerekmediği ya-yınlandı(113,130). HCV 3'UTR de bulunan X bölgesinin, IRES'e bağımlı gerçekleşen HCV translasyonunun etkinliğini artırdığı gösterildi(131). Bazı çalışmalarda 5'UTR'ye bağlandığı gösterilen La antijen, poly(C)-binding protein, heterojen nükleer ribonükleoprotein L ve poli-pirimidin alanı bağlanma proteini (poly pyrimidine-tract-binding protein, PTB) gibi birkaç hücresel faktör tanımlanmıştır(132-135).



Şekil 2: HCV'nin öngörülen yaşam döngüsü

1-HCV partikülü hücreye yapışır. 2- Virüs hücre içine reseptör aracılıklı-endositoz ile alınır. 3- Virüs genomu sitoplazmada kılıftan kurtulur. 4- Genomik (+) tek iplikli RNA, IRES vasıtasıyla ribozomlara yönlendirilir. 5-Ribozomda viral polipeptin translasyonu gerçekleştirilir. 6,7-Hücresel ve viral proteazlarla yapısal ve yapısal olmayan proteinler oluşturulur. 8- Yapısal olmayan proteinler replikaz kompleksini meydana getirirler. 9- Replikaz kompleksi içinde yer alan NS5B RdRp enzimi, (+) iplikli viral RNA'dan, (-) iplikli RNA sentezinin oluşumunu katalizler. 10- NS5B RdRp enzimi (+) iplikli yeni viral RNA ipliğinin sentezini katalizler. 11,12- Yapısal proteinler ve yeni üretilen (+) iplikli viral RNA birlikte viryonu oluştururlar. 13-ER ya da ER benzeri kompartmanlarda, viryon tomurcuklanarak zarf kazanır. 14- Olgunlaşan virüsün, golgi cisimciğinde transportu gerçekleşir. 15- Yeni olgun HCV virüsü ekzositoz yoluyla dışarıya salınır.

IRES'le viral genomun ribozomlara yönlendirilmesinden sonra, hücresel ve viral proteazlarla katalizlenen kotranslasyonel ve posttranslasyonel işlemlerle, yapısal ve yapısal olmayan proteinler meydana getirilirler(84,85). Polipeptinin yapısal C-NS2 bölgesi, hücresel sinyal peptidazlarla C/E1, E1/E2, E2/P7 ve P7/NS2 noktalarından bölünür(113).NS2 dizisinin büyük

bir bölümünün ve NS3'ün proteaz alanının birlikte şifrelediği proteinaz, NS2-NS3'ün proteolitik olarak ayrılma işleminde, otoproteaz aktivitesi gösterir. NS3 serin proteinaz, poliprotein yapısız olmayan proteinlerini (NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A, NS5A/5B) birbirinden ayırmaktadır(113,124). Ayrılan viral NS2-5B proteinler ve konakçı proteinlerin, ER'un sitoplazmik yüzeyinde kalıp viral RNA ile birlikte replikâz kompleksini oluşturdıkları düşünülmektedir(113,124). Replikaz kompleks oluşumu ile translyasyonun ve replikasyonun ayrı hücrel bölümlerde gerçekleşmesi sağlanmaktadır(113). Kofaktörler ile birlikte NS5B polimeraz (RdRp) enzimi, (+) iplikli viral RNA genomunu kalıp olarak kullanarak, (-) iplikli RNA sentezini katalizler. Üretilen (-) iplikli RNA'dan, viryonun yeni (+) iplikli RNA sentezi gerçekleştirilir(108).

Viryonun birleşmesi, endoplazmik retikulumda olgunlaşan C, E1 ve E2 yapısal proteinlerinin birbirleriyle olan etkileşimlerine bağlıdır. HCV zarfının, konakçı hücre membranından türev aldığı düşünülmektedir. Bu zarf aynı zamanda glikoproteinler E1 ve E2'yi içermektedir. C proteini ise polimerizasyon ile, (+) iplikli RNA'yı barındıran nükleokapsiti oluşturmaktadır. Viryonun toplanmasından sonra, HCV partikülünün ER ya da ER-türevli bir bölümde tomurcuklandığı ve olgunlaşan virüslerin Golgi cisimciği ile transportunun gerçekleştiği hipotez edilmektedir. Sonuçta virüslerin hücre dışına ekzositozla çıktığı sanılmaktadır(113,86,91,124).

4.2.4 HCV'ye immün yanıtlar

4.2.4.1 Humoral ve hücrel immün yanıtlar

Virüsün replikasyon hızı ile bağışıklık sisteminin yanıt hızı, özgüllüğü ve etkinliği arasındaki dengenin, kronik HCV'nin enfeksiyon sürecini etkilediği düşünülmektedir(136). Bu kapsamda bazı HCV hastalarında, akut enfeksiyon sonrası görülen spontan iyileşmenin, humoral ya da hücrel immün yanıtların farklılıklarından dolayı geliştiği önerilmektedir (137, 138). HCV enfeksiyonuyla mücadelede humoral immün sistemin rolü, henüz açıkça ortaya konabilmiş değildir(136). Bununla birlikte kronik HCV enfekte hastaların plazmasında ve HCV aşılı şempanzelerde, virüse karşı oluşan antikorların belirlenmesi, humoral yanıtın varlığını göstermektedir(139,140).

HCV antikorlarının varlığında, HCV enfeksiyonunun genellikle inatla devam etmesi, araştırmalarda dikkati çeken bir konudur. Özellikle virüs genomun mutant bölgelerinin, immün yanıtta kaçışta önemli olduğu düşünölmektedir. Bu doğrultuda yapılan çalışmaların bir bölümünde, HCV nin mutant bir epitopunu içeren E2 geni incelenmiştir. Araştırmalarda, E2 geninin kapsadığı yüksek oranda değişken bölgeler (hypervariable regions, HVRs) adı verilen dizilerde bulunan mutasyonlar ile kronik HCV hastalarının artmış viral yükleri ilişkili bulunmuştur(141-147).

HCV enfeksiyonunda hüneral immün yanıt gibi, hücre aracılıklı immünitenin rolü de tam olarak izah edilememektedir. Yapılan çalışmalarda CD4+T helper ve sitotoksik T lenfositler (cytotoxic T lymphocytes, CTL) aracılıklı immünitenin, HCV enfeksiyonunun prognozuna olan etkileri araştırılmıştır. Özellikle bazı araştırmalarda, akut HCV enfeksiyonunda görölen güçlü ve sürekli T helper yanıtının, viral eradikasyon ile ilişkili bulunduğu rapor edildi(137, 148). Benzer olarak IFN α tedavisine yanıtlı kronik HCV hastalarında, yanıtız olanlara göre, daha fazla CD4 + T helper yanıtı alındığı yayınlandı(149,150).

Diğer taraftan kronik HCV hastalarının periferal kan ile intrahepatik lenfositik infiltratlarında ve virüs aşılı şempanzelerin karaciğerinde, HCV spesifik CTL 'ler belirlendi(151-157). Ayrıca kronik HCV hastalarında, düşük virüs yükü ile daha güçlü CTL yanıtının ilişkili olduğu yayınlandı(158). Bu durum, HCV'ye spesifik CTL yanıtı ile aşırı virüs üretiminin kontrol altında tutulduğunu akla getirmektedir.

HCV nin direk sitopatik etkisinin olup olmadığı konusunda tartışmalar devam etmektedir. Bazı araştırmacılar, HCV kaynaklı direk bir sitopatik etkinin olmadığını, meydana gelen hepatik etkilerin virüse karşı gelişen koruyucu immüniteden kaynaklandığını önermektedirler. HCV'ye spesifik CD4+ T helper aktivitesinin, fibrozis ve portal yol iltihabı ile ilişkili olduğunun gösterilmesi virüsün dolaylı yoldan sitopatik etkisi olduğu fikrini desteklemektedir. Ayrıca hüneral immünitede rol oynayan CTL 'lerin, kronik karaciğer hastalığının gelişimine ve ilerlemesine katkısının olabileceği yayınlandı. Çalışmalarda daha düşük viremi düzeyi bulunan kronik HCV hastalarının intrahepatik CTL aktivitelerinin, daha aktif hepatoselöler hasar ile ilişkili bulunduğu rapor edildi(158-160).

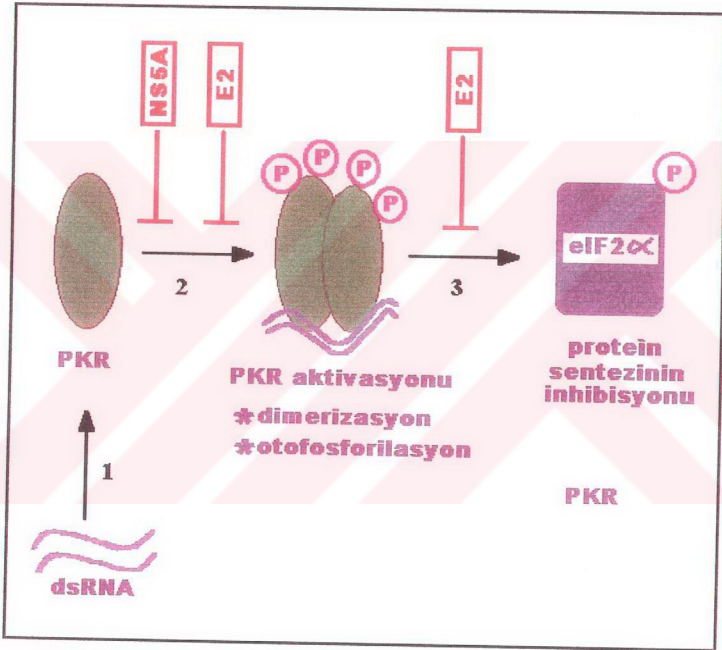
CD4+T helper hücre yanıtları; T helper tip 1 (Th1) ve T helper tip 2 (Th2) hücre yanıtları olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Th1 hücrelerinin salgıladıkları sitokinler olan interlekin 2 (IL-2), tümör nekrozis faktör α (TNF α) ve IFN- γ ; viral replikasyonun kontrolünde önemli görevler üstlenmektedirler(136). Th1 sitokinleri, CTL oluşumunu ve natural killer (NK) hücre aktivasyonunu indüklerken, Th2 sitokinleri genellikle Th1 aktivitesinin gelişimini inhibe etmektedirler(136). Yapılan çalışmalarda, akut enfeksiyon sırasında virüs eradikasyonu görülen HCV hastalarının güçlü Th1 yanıtı gösterirlerken, Th2 yanıtını düşük düzeyde gösterdikleri ya da hiç göstermedikleri yayınlandı. Tersine kronik enfeksiyon sırasında, hastaların baskın Th2 yanıtına karşılık, zayıf Th1 yanıtı gösterdikleri açıklandı. Bu çalışmalar Th1 sitokinlerinin HCV enfeksiyonunun kontrolünde önemli rol oynadıklarını akla getirmektedir (161). Th2 sitokinleri olan IL-4 ve IL-10, enflamasyon ve nekroz yaratan Th1 yanıtını down regüle etmektedirler. Bu yüzden Th2 sitokinlerinin, Th1 hücrelerinin hasara yolaçan sonuçlarına engel olmak için görev aldıkları düşünülmektedir(136,161).

CD4+ T helper hücrelerinin indüklediği Kupffer hücreleri, NK hücreleri aktive ederler. NK hücreler, virüse karşı immün sistemin savunmasında görev alan ilk hücre soyları arasında bulunmaktadır(162). Bu hücreler, enfekte hücrelerin nonspesifik lizizinden sorumludurlar (136). Çeşitli virüs enfeksiyonlarında NK hücre fonksiyonlarının rolü, insanda ve farklı hayvan modellerinde yaygın olarak çalışılmıştır. NK hücreleri, virüs enfeksiyonu sırasında hızlı ve bol miktarda IFN- γ üretebilme özelliğine sahiptir. Bu özellik, NK hücrelerinin immün sistemde anahtar bir fonksiyonu olarak görülmektedir(163). Kronik HCV enfeksiyonunda, NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir(164). Yapılan başka bir çalışmada HCV E2'nin hücrel CD81 reseptörüne bağlanmasıyla, NK hücrelerinin fonksiyonel inhibisyonunun sağlandığı rapor edilmiştir. Bu sonuç HCV'nin immün yanıtı kaçışta, spesifik olarak NK hücrelerinin antiviral yanıtlarını hedef aldığını göstermektedir(165).

4.2.4.2 HCV enfeksiyonunda PKR enziminin fonksiyonu

Hücrel PKR enzimi, immünyetede viral enfeksiyona karşı önemli görevler üstlenmektedir. Serin/treonin spesifik bir enzim olan PKR, normalde çoğu memeli hücreleri ile dokularda, düşük düzeyde, inaktif durumda bulunmaktadır. PKR'nin aracılık ettiği ökaryotik translasyon

başlangıç faktör 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α) fosforilasyonu, viral enfekte hücrenin translasyonel ve replikasyonel inhibisyonunda anahtar rol oynar(166). PKR messenger RNA (mRNA) sentezi, viral enfeksiyon sırasında IFN' la indüklenir (Şekil 3).



Şekil 3: PKR aracılıklı eIF2 α fosforilasyonunun mekanizması

1- PKR, dsRNA'ya bağlanır. 2-PKR dimerizasyonu gerçekleşir. PKR otofosforilasyonla aktif hale geçer. 3- Aktif hale geçen PKR, eIF2 α 'yı fosforile eder. Hücresel ve viral protein sentezi inhibe edilir.

Eksprese olan PKR, çift iplikli RNA (ds-RNA)'ya bağlanır. Bunun üzerine dimerize olan PKR, otfosforilasyon yoluyla aktif hale geçer. Aktive olan PKR, eIF2'nin α alt birimini ser 51 aminoasiti üzerinden fosforile eder(13,167-172). Daha sonra fosforile olan eIF2 α ; ö-karyotik translayon başlangıç faktörü 2B (eIF2B)'nin inaktivasyonuna neden olarak hücrel ve viral protein sentezine engel olur(13,173).

HCV genotiplerinin IFN dirençliliği ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda, PKR enziminin fonksiyonu araştırılmaktadır. IFN'a dirençli olan HCV genotip1 suşlarına ait NS5A proteininin, mayada PKR ile spesifik olarak etkileştiği ve enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterildi (31). PKR bağlanma alanı adı verilen, NS5A'nın 2209. ve 2274. kodonları arasında kalan bölgenin, PKR ile heterodimer kompleks bir yapı oluşturduğu ve enzimin homodimerizasyonuna engel olduğu açıklandı(43). Diğer taraftan HCV genotip1a suşuna ait E2 proteininin de, PKR aktivasyonunu inhibe ettiği gösterildi(174). E2'nin bir yalancı substrat gibi davranarak PKR'nin hem otfosforilasyonunu, hem de eIF2 α fosforilasyonunu engellediği düşünülmektedir (13).

4.2.5 HCV enfeksiyonunun tedavisi

Akut enfeksiyon sonrasında, HCV'nin kronikleşme oranlarının, daha öncede belirtildiği gibi % 50-85 arasında değiştiği rapor edilmiştir(7). HCV hastalarının akut enfeksiyon sonrasında kronik enfeksiyon geliştirme oranları, HCV genotipleri arasında farklılıklar göstermektedir. Kronikleşme oranları; genotip 1b için %92, genotip 1a ile 3a için %50, genotip 2c için ise %33 olarak rapor edildi(175).

Kronik HCV enfeksiyonunu önlemek amacıyla, son yıllarda IFN α ve IFN α +Ribavirin kombinasyon tedavisi yaygın olarak kullanılmaktadır(13). HCV enfeksiyonunda IFN α tedavisi, viral yükü ve ALT düzeylerini düşürerek HCC gelişim riskini azaltmaktadır(176). IFN dozunun artırılması, tedavi süresinin uzatılması ya da kimyasal olarak modifiye edilmiş IFN kullanılması, kronik HCV hastalarının yanıt hızlarını artırmaktadır(177,178). Ayrıca IFN tedavisinin ribavirin ile birlikte bir kombinasyonda verilmesi de viral yanıt hızını artırmaktadır (14,15).

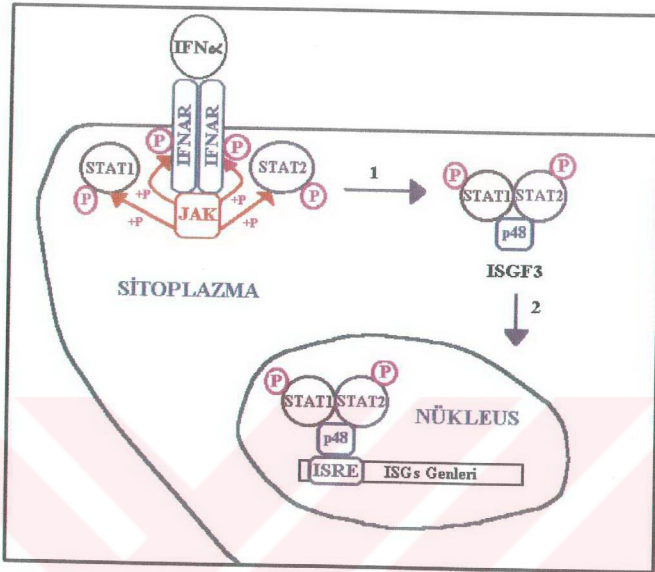
Kronik enfeksiyon sırasında, IFN tedavisi uygulanan hastaların dirençliliğinde HCV genotiplerinin rolünü araştıran çalışmalar yayınlanmıştır. Yayınlarında HCV genotip 2 ve 3 ile enfekte hastaların, IFN α tedavisine HCV genotip 1 ile enfekte hastalara göre genellikle daha iyi yanıt verdikleri rapor edildi. IFN α tedavisine, HCV genotip 1b ile enfekte hastaların tam yanıt hızı %10-40, HCV 2a ve 2b ile enfekte olanların tam yanıt hızı %60-90 olarak bildirilmiştir(14,32,177,179). Ayrıca IFN α 2b+Ribavirin tedavisi uygulanan genotip 2 ve 3 ile enfekte HCV hastalarında, devam eden virolojik yanıt oranı %65 iken, genotip 1 ile enfekte olanlarda bu oranın %30 olduğu rapor edildi(14,15).

IFN tedavisine verilen biyokimyasal yanıtlarla genotipik farklılıkların ilişkisine bakıldığında da, genotip 1 enfekte hastaların tedaviye dirençliliği görülmektedir. Böyle bir çalışmada, 6 ay uygulanan IFN tedavisi sonunda HCV genotip 2 ile enfekte hastaların %60-70'inde, genotip 1 ile enfekte olanların %10-15'inde tam biyokimyasal yanıtın alındığı yayınlandı (180).

4.2.5.1 IFN α 'nın etki mekanizması

IFN'lar; çift iplikli RNA, endotoksin, mitojenik ve antijenik uyaranlar ile viral enfeksiyona karşı üretilmektedir. α , β ve ω 'yi içeren tip I IFN'lar, viral enfeksiyona karşı değişik hücre tiplerinde salgılanırlar. Tip II-IFN- γ ; mitojenik ve antijenik uyarılara karşı, T hücreleri ve makrofajarda indüklenmektedir(13).

Tip I IFN α sinyal iletim yolunun ilk adımında, IFN α , reseptörüne (IFN alfa reseptör, IFNAR) bağlanır (Şekil 4). Bağlanma sonucunda dimerize olan IFNAR, Janus kinazı (Janus kinase,JAK) aktive eder. Aktive olan JAK, IFNAR'ı tirozin aminoasiti üzerinden fosforiller. Fosforile IFNAR'ın tirozin aminoasiti yakınına, aktive edilmiş transkripsiyonun sinyal iletileri 1 ve 2 (signal transducers of activated transcription, STAT1 ve STAT2) yaklaşır. Sonra Janus kinaz yaklaşan STAT1 ve 2'yi fosforiller.



Şekil 4: IFN α 'nın sinyal iletim yolu

1-IFN α , reseptörü IFNAR'a bağlanır. Dimerize olan IFNAR, JAK'ı aktive eder. Aktive JAK IFNAR'ı fosforiller ve daha sonra fosforilasyon site'na yaklaşan STAT 1 ve 2'yi de fosforiller. 2-Fosforile STAT 1 ve STAT 2, p 48'e bağlanarak heterotrimerik kompleks ISGF3'ü oluşturur. ISGF3 nükleusa geçerek ISRE'ye bağlanır ve ISG genlerinin transkripsiyonel aktivasyonu gerçekleştirilir.

Fosforillenen STAT1 ve 2, p48'e bağlanır ve IFN-stimüle gen faktör 3 (ISGF3) adı verilen heterotrimerik bir kompleks oluştururlar(181,13). Daha sonra ISGF3, sitoplazmadan nükleusa transloke olur. Nükleusta ISGF3, IFN α 'un uyardığı genlerin (IFN α -stimulated genes ISGs) promoter bölgesinde bulunan IFN-stimüle-response elemente (ISRE) bağlanır ve ISG'lerin transkripsiyonel aktivasyonunu gerçekleştirir(182). ISG'ler arasında; 2',5'-oligoadenilat sentetaz enzimi (2-5 OAS), Mx proteinleri, MHC antijenleri ve PKR yer almaktadır(13).

4.2.6. Virüsün epidemiyolojisi

Dünyanın değişik bölgelerinde, HCV'nin 6 majör genotipi ile çok sayıda subtipi tanımlanmıştır(81). HCV genotip 1,2 ve 3, dünyanın bir çok bölgesinde görülmekle birlikte coğrafik alana göre yaygınlığı değişmektedir(24). HCV genotip1a ve 1b'nin, çoğunlukla ABD ve Avrupa'da baskın olarak buldukları yayınlandı(24,180,183,184). Türkiye'de de genotip 1b yaygındır(44). Japonya'da, HCV enfeksiyon olgularının % 73'ü, genotip 1b ile enfektedir (185). HCV genotip 2a ile 2b'nin; Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'da, genotip 2c'nin, kuzey İtalya'da daha yaygın olduğu rapor edildi. HCV genotip 3a, özellikle Avrupa ve ABD'de intravenöz ilaç kullananlar arasında, sıkça görülmektedir(186). HCV genotip 4, Kuzey Afrika ve Orta Doğu'da daha fazla bulunmaktadır(24,187). Genotip 5 ve 6 sırasıyla Güney Afrika ve Hong Kong'da sık görülmektedir(188,189). Güneydoğu Asya'da, genotip 7, 8, 9,10 ve 11 tanımlandı. Ancak bu izolatlar, aynı grubun varyantları kabul edilerek genotip 6 içinde sınıflandırıldılar(190-193).

ABD'de, yıllık tahminen 38.000 yeni HCV enfeksiyonunun meydana geldiği rapor edildi(12). ABD'de meydana gelen akut enfeksiyonların sadece %16'sında, belirti görüldüğü açıklanmıştır(194). Ayrıca ABD'de HCV kaynaklı karaciğer hastalıkları yüzünden, yılda 8.000 -10.000 ölümün gerçekleştiği bildirilmiştir(12).

HCV başlıca parenteral yollarla bulaşmaktadır. Enfeksiyonun geçişinin önemli kaynakları arasında; taranamayan kan ya da kan ürünleri, damar içi uyuşturucu kullanımı iğne batması, hastanın bakımında kontamine enstruman kullanımı ve dövme (tatuaj) bulunmaktadır(12). Emzirme yoluyla anneden bebeğine HCV geçişi, önemli bir bulaş kaynağı olarak görülmemektedir(195).

HCV'nin cinsel yolla geçişi ile ilgili kesin veriler bulunmamaktadır. Bununla birlikte 1991 ve 1997 yılları arasında ABD'de yapılan çalışmada, akut hepatit C'li hastaların yaklaşık %12'sinde, ilaç kullanımı ve kan transfüzyonu öykülerinin bulunmamasına karşın HCV pozitif bulunan bir partner ile cinsel ilişkilerinin olduğu rapor edildi. Seksüel geçişli hastalıkların (Sexually Transmitted Diseases, STD) klinik çalışmasında, HCV enfekte erkeklerin dişi partnerleri arasında enfeksiyon riskinin arttığı yayınlandı. Aynı çalışmada HCV enfekte kadının erkek partnerleri için artmış böyle bir riskin bulunmadığı açıklandı(196). Diğer taraftan

eşcinsel erkeklerde, HCV enfeksiyonunun yaygınlığının heteroseksüellere göre önemli oranda farklı olmadığı yayınlandı(197).

ABD'de genel popülasyon çalışmasında, HCV'nin yaygınlığının Afrika kökenli Amerikalılar arasında % 3.2, Meksika kökenli Amerikalılar arasında % 2.1, İspanyol olmayan Beyazlar arasında % 1.5 olduğu rapor edilmiştir. Raporla ayrıca, sosyoekonomik düzeyi daha düşük kişiler ile 20-35 yaş arasındaki bireyler arasında, HCV'nin daha fazla yaygın olduğu açıklandı (194).

Türkiye'de HCV yaygınlığı, literatürdeki farklı kaynaklara göre % 0.3-4 arasında değişmektedir(2-5). Özellikle HCV prevalansı bazı hasta gruplarında daha yüksektir. 1993 yılında Avrupa Diyaliz ve Transplant derneğine göre, Türkiye'deki hemodiyaliz ve organ transplantasyon hastalarında HCV prevalansı % 17.7'dir. Türk Nefroloji Derneğinin 1996, 1997 ve 1998 yıllarındaki verilerinden, aynı hasta gruplarında HCV prevalansının sırasıyla % 38, % 52.6 ve % 63.2 olduğu görülmektedir(6). Ayrıca Türkiye'de yapılan araştırmalara göre kronik karaciğer hastalıklarında HCV prevalansının % 13-27 arasında değiştiği rapor edilmiştir (8,9).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1 Gereç

5.1.1 Çalışma grubu

Temmuz 1997 ve Ocak 2002 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji bilim dalı tarafından, kronik hepatit C enfeksiyonu tanısı konulan, HCV genotip 1b ile enfekte 19 hastanın serumu değerlendirildi. Hastalara kronik HCV enfeksiyonu tanısı, pozitif anti-HCV antikorları (2. Jenerasyon test), serum HCV RNA pozitifliği (nested RT-PCR) ve karaciğer biyopsi sonuçları dikkate alınarak konuldu. Kronik enfeksiyon tanısı konularak tedavi olması öngörülen hastalar, Gastroenteroloji bilim dalında 6ay-1yıl boyunca haftada 3 kez, 3-5 mÜ IFN α 2a ve ya IFN α 2b ile günde 1000-1200 mg ribavirin tedavisi aldı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların bilgilendirilmiş onayları alındıktan sonra, serum örneklerinin değerlendirilmesi için hazırlıklar başlatıldı (Ek). Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, hastaların rutin tanı aşamalarında ya da tedavi sırasında alınan serum örneklerini toplayarak -70°C'de muhafaza etti. Hasta serumlarında HbsAg, insan immün yetmezlik virüsü 1,2 (Human Immunodeficiency Virus 1,2; HIV1,2), anti-HCV, HCV-RNA ve virüs genotiplendirme testlerini uyguladı (Tablo 2). Tüm hasta serumlarının HbsAg ve HIV1,2 test sonucu, negatif bulundu. Hasta serum örneklerinde enfekte HCV'nin genotipi ile subtipini, RFLP testi ve Innolipa (Innogenetics) kitlerini kullanarak belirledi. Ayrıca Cobas AmpliCor Monitor kiti (Roche Diagnostic Systems) ile hasta serumlarının viral yükünü saptadı.

Tanı aşamasında, karaciğer biyopsi örnekleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD tarafından ışık mikroskopunda, rutin hematoksilin-eozin düzeyinde masson-trikrom ve retikulin boyaları da kullanılarak modifiye histolojik aktivite indeksi (HAI) ve fibrozis evresi açısından değerlendirildi (Tablo 2). HAI'nin belirlenmesinde; portal alan enflamasyonu (0-4), odaksal hepatosit nekrozu ve apoptozisi (0-4), confluent hepatosit nekrozu (0-6) ve interfaz hepatiti (piecemeal nekroz) dikkate alınarak, Ishak ve arkadaşlarının önerdiği şekilde skorlandı. Fibrozis (0-6) derecesi de aynı sistemle skorlanarak, ayrı olarak belirtildi (198).

Ege üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD; DEU- Tıbbi Biyoloji ve Genetik anabilim dalı laboratuvarlarında elde ettiğimiz PCR ürünlerinin DNA dizi analizini ABI 310 analizler cihazında gerçekleştirdi.

5.1.2 Hasta gruplarının oluşumu

5.1.2.1 Yanıtların sınıflandırılması

Tam Yanıtlı Hasta (TYL): Tedavinin kesilmesinden sonra en az 6 ay boyunca, RT-PCR testi ile HCV RNA negatif bulunan ve ALT enzim düzeyi normal seyreden hasta grubu için tanımlandı. 3 hasta (% 15.79) bu grupta yer aldı (Tablo 2).

Biyokimyasal Yanıtlı Hasta (BYL): Tedavi bitiminden itibaren en az 6 ay boyunca, HCV RNA pozitif olan ve ALT enzim düzeyleri normal seyreden hasta grubu için tanımlandı. 5 hasta (% 26.32) bu grupta yer aldı (Tablo 2).

Tam Yanıtsız Hasta (TYS) : Tedavi bitiminden sonra 6.ayda, RT-PCR testi ile HCV RNA pozitif bulunan ve ALT enzim düzeyleri anormal seyreden hasta grubu için tanımlandı. 11 hasta (% 57.89) bu grupta yer aldı (Tablo 2).

5.1.2.2 ISDR tipinin sınıflandırılması

Japonya'da hepatit C virüsünün IFN dirençliliği ile ilgili yapılan bir araştırmada, Enomoto N. tarafından tanımlanan kriterlere göre, çalışmada yer alan herbir hastanın enfekte bulunduğu virüsün ISDR bölgesi tipi belirlendi(32).

Doğal tip: HCV-ISDR bölgesinde amino asit mutasyonu bulunmamaktadır. 13 hasta (%68) bu grupta yer aldı.

Orta tip: HCV-ISDR bölgesinde 1-3 sayıda amino asit mutasyonu bulunmaktadır. 4 hasta (% 21) bu grupta yer aldı.

Mutant tip: HCV-ISDR bölgesinde 4 ve üstü sayıda mutasyon bulunmaktadır. 2 hasta (% 11) bu grupta yer aldı.

Tablo 2:Kronik HCV hastalarının laboratuvar test sonuçları ve tedavi yanıtları

PN: Piecemeal Nekroz, SN: Spotty Nekroz, PI: Portal İnflamasyon, CN: Confluent Nekroz
 HAI: Histolojiksel Aktivite İndeksi

Tez No	Tedavi Öncesi Biopsi Sonuçları							Tedavi Öncesi Mikrobiyoloji Sonuçları					Tedavi Sonrası Yanıt		
	PN	SN	PI	CN	HAI/18	Fibrosis/6	HCV					HCV			
							aHCV	RNA	HbsAg	HIV1,2	Subtip	ALT	RNA	YANIT	
1	1	2	4	0	7	2	+	+	-	-	1b	N	-	TYL	
2	3	5	4	0	12	3	+	+	-	-	1b	N	-	TYL	
3	1	1	4	0	6	3	+	+	-	-	1b	N	-	TYL	
4	2	2	3	1	8	1	+	+	-	-	1b		+	BYL	
5	2	2	1	0	5	1	+	+	-	-	1b	N	+	BYL	
6	2	1	4	0	7	2	+	+	-	-	1b	N	+	BYL	
7	1	1	4	0	6	1	+	+	-	-	1b	N	+	BYL	
8	6	3	3	0	12	2	+	+	-	-	1b	N	+	BYL	
9	2	2	2	0	6	2	+	+	-	-	1b	Y	+	TYS	
10	1	1	4	0	6	5	+	+	-	-	1b	Y	+	TYS	
11	5	1	4	0	10	1	+	+	-	-	1b	Y	+	TYS	
12	0	2	4	0	6	2	+	+	-	-	1b	Y	+	TYS	
13	0	1	2	0	6	3	+	+	-	-	1b	Y	+	TYS	
14	1	1	3	0	5	1	+	+	-	-	1b	Y	+	TYS	
15	0	1	3	0	4	2	+	+	-	-	1b	Y	+	TYS	
16	2	1	3	0	6	1	+	+	-	-	1b	Y	+	TYS	
17	1	1	1	0	3	3	+	+	-	-	1b	Y	+	TYS	
18	1	2	2	0	5	1	+	+	-	-	1b	Y	+	TYS	
19	1	1	3	0	5	1	+	+	-	-	1b	Y	+	TYS	

5.2 Yöntem

5.2.1 RNA elde edilmesi

5.2.1.1 Solüsyonların hazırlanması

dEPc.dH2O: 1 lt 'lik balon jodede, 1000 ml 18 MΩ 'luk distile su içine 1 ml dietilpirokarbonat (dEPc, Sigma D 5758) eklendi. Bir gece çeker ocakta ağız açık olarak bekletildi. Sonra 121°C 'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

4M NaCl: 23,2 gr sodyum klorür (NaCl, Sigma S 3014) tartılarak, 100 ml 'lik balon jodede bulunan 40 ml dEPc.dH2O 'da çözünmesi sağlandı. dEPc.dH2O ile 100 ml 'ye tamamlandı.

1M Tris: 12,1 gr Tris (Sigma T- 6066) tartılarak, 100ml 'lik balon joje 'de 90ml dEPc.dH2O içinde çözünmesi sağlandı. Konsantr hidroklorik asit (HCL) ile pH:8 'e ayarlandı. Balon jojenin hacmi, dEPc.dH2O ile 100 ml 'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi.

0,2 M EDTA: 7,44 gr. ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA, Sigma E-5134) tartılarak 100 ml 'lik balon jodede, 90 ml dEPc.dH2O ile çözünmesi sağlandı. Sodium hydroxide (NaOH) ile pH: 8'e ayarlandı. Balon joje, dEPc.dH2O ile 100 ml 'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi.

%10 SDS : 1 g sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma L- 4390) tartıldı. 10 ml dEPc.dH2O içinde çözünerek hazırlandı. Otoklavlanarak steril edildi.

Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol: 25 ml Fenol (Sigma P4682), 24 ml kloroform (Sigma C 2432) ve 1ml izoamilalkol (Sigma I 9392) 100 ml 'lik şişede karıştırıldı. pH: 4.2'ye HCl ile ayarlandı.

3 M NaOAc: 24,6 gr sodyum asetat (NaOAc, Sigma S-2889) tartılarak 100 ml 'lik balon jodede 90 ml dEPc.dH2O ile çözünmesi sağlandı. pH: 5,2'ye glasiyel asetik asit ile ayarlandı. Balon joje 100 ml 'ye dEPc.dH2O ile tamamlandı.

% 80 Etanol: Mezürle 80 ml absolute etanol (Carlo Erba 308641/002) ölçülerek 20 ml bi-distile su ile 100 ml 'ye tamamlandı.

Glikojen (20 µg /50 µl): 4 mg glikojen (Sigma G 1767) tartularak 10 ml bidistile su ile sulandırıldı. -20 C ° de, 1 ml' lik ependorflarda alikotlanarak saklandı.

Proteinaz K (10mg/ml): 50 mg proteinaz K (Sigma P2308) tartularak 5 ml bidistile su içinde çözünmesi sağlandı. -20 °C 'de, 1 ml' lik ependorflarda alikotlanarak saklandı.

Tris, NaCl, EDTA (TNE)+SDS hazırlığı: 214,3 ml dEPc.dH2O; 6,9 ml ,4 M NaCl; 13,75 ml, 1M Tris (pH: 8); 1,375 ml, 0.2 M EDTA (pH: 8); 13,75 ml % 10 SDS mezür ve steril pipetler kullanılarak ölçüldü ve karışması sağlandı. Karışım otoklavlanarak steril edildi.

5.2.1.2 RNA eldesi

Her bir hastaya ait serum örneğinden RNA, proteinaz K yöntemiyle elde edildi(199). Ayrıca 1 ependorf tüpünde ajirojen su negatif kontrol olarak çalışıldı.

- 1-Tampon hazırlandı. Tek tüp için ; 0,375 ml TNE+SDS; 0,042 ml proteinaz K; 0,0084 ml glikojen steril pipet uçları ile ölçülerek karıştırıldı.
- 2- Hazırlanan tampon 10 dk 37 °C 'de inkübe edildi.
- 3- Her bir tüpün içine 400 ul tampon eklendi.
- 4- Aynı tüplere 100 ul serum eklendi. Vortekste 5-10 sn karıştırıldı.
- 5- Tüpler 37 °C 'de 2 saat inkübe edildi.
- 6- 450 ul Fenol:Kloroform:İzoamilalkol karışımı eklendi.
- 7- 5 dk 2000 rotorda vortekslendi.
- 8- 15.000 rpm 'de 20 dk santrifüj edildi.
- 9- Süpernatant her bir tüpte 40 ul, 3M NaOAc içeren tüplere aktarıldı.
- 10- 800 ul (yaklaşık 2 volüm) soğuk % 100' lük etanol eklendi. Vorteks kullanmadan yavaşça karıştırıldı.

- 11- Bir gece -20°C 'de inkübe edildi.
- 12- 15.000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
- 13- Pellet % 80'lik, 600 ul etanol ile 2 kere yıkandı.
- 14- 15.000 rpm'de oda ısısında, 5dk santrifüj edildi.
- 15- Pellet 42°C ısı bloğunda, 30 dk bekletilerek kurutuldu.
- 16- 25 ul dEPc.H2O ile sulandırıldı. Test öncesinde enaz 10 dk oda ısısında bekletildi.

5.2.2 RT-PCR ile cDNA elde edilmesi

5.2.2.1 Malzemelerin hazırlanması

MuMLV Reverse Transcriptase enzimi (Fermentas EP0441): Mikrolitresinde 200 U bulunan 10.000 U'lik stoktan, reaksiyon başına 2.5 U/ul olacak şekilde 0.25 ul moloney murine leukemia virus (MuMLV) enzimi ilave edildi.

5X Buffer (Fermentas EP0441): MuMLV reverse transcriptase enzimi ile birlikte 0.4 ml'lik hacimde bulunmaktadır. Reaksiyon başına bu stoktan 4 ul eklendi.

Random Hekezamer (Promega C1181): 20 ug random hekezamer 100 pmol/ul olacak şekilde alikotlandı. Bu stoktan reaksiyon başına 50 pmol, 0.5 ul random hekezamer eklendi.

dNTP (Bohringer): 100 mM'lık her bir deoksinükleozid trifosfat (dNTP)'tan (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 ul alınıp, 0.2 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 60 ul distile su eklenerek 100 ul volümde, 10 mM'lık dNTP karışımı hazırlandı. Ve -20°C 'de derin dondurucuda saklandı. PCR reaksiyonunda bu stoktan alınan dNTP karışımı kullanıldı.

5.2.2.2 cDNA eldesi

Tek tüp reaksiyon için toplam 20 ul'lik karışım hazırlandı(200). 1 pozitif kontrol ve 1 negatif kontrol içinde ayrı birer reaksiyon karışımı oluşturuldu (Tablo 3). Pozitif kontrol için HCV RNA içerdiği kanıtlanmış hastaya ait cDNA  rneği kullanıldı. Negatif kontrol olarak RNA eldesinde kullanılan ajirojen su çalışıldı.

Tablo 3: RT-PCR reaksiyon karışımı

	İlk konsantrasyon	Kullanılan Miktar	Son Konsantrasyon
5X buffer	5X	4.00 ul	1X
10 mM dNTP	10 mM	0.50 ul	0.25 mM
MuMLV enzimi	200 U/ul	0.25 ul	2.500 U/ul
Random Hekzamer	100 pmol/ul	0.50 ul	2.500 pmol/ul
RNA (Kalıp)	5 ug/25ul	5.00 ul	0.050 ug/ul
ddH2O	–	9.75 ul	–

Hazırlanan karışım, thermo cycler (Peltier effect, MJ Research PTC-100, programmable thermal controller) cihazında, 1 saat 42  C, 10 dk 70  C' de inkübasyon programı uygulandı.

5.2.3 Nested PCR reaksiyonu

5.2.3.1 Malzemelerin hazırlanması

Taq DNA Polimeraz enzimi (Fermentas EP0402): Mikrolitresinde 5 U bulunan, 500 U thermophilus aquaticus DNA (Taq DNA) polimeraz enziminden reaksiyon başına 0.03 U/ul olacak şekilde 0.3 ul eklendi.

10X PCR buffer (Fermentas EP0402): Taq DNA polimeraz enzimi ile birlikte 3.0 ml'lik hacimde bulunmaktadır. Reaksiyon başına bu stoktan 5 ul eklendi

Magnezyum klorür (MgCl₂, Fermentas EP0402): Taq DNA polimeraz enzimi ile birlikte 25 mM, 3 ml'lik hacimde bulunmaktadır. Reaksiyon başına bu stoktan 5 ul eklendi.

3 mM dNTP (Böhringer): 10 mM'lık stoktan 15 ul alınıp, 50 ul hacime bidistile su ile tamamlandı. Reaksiyon başına 0.048 mM olacak şekilde 0.8 ul eklendi.

5'Dış Sense Primer (DSP, MWG-Biotech): 20 pmol/ul'lik stoktan, reaksiyon başına 50 pmol/ul olacak şekilde 2.5 ul eklendi.

3'Dış Antisense Primer (DASP, MWG-Biotech): 20 pmol/ul'lik stoktan, reaksiyon başına 50 pmol/ul olacak şekilde 2.5 ul eklendi.

5'İç Sense Primer (İSP, MWG-Biotech): 20 pmol/ul'lik stoktan, reaksiyon başına 50 pmol/ul olacak şekilde 2.5 ul eklendi.

3'İç Antisense Primer (İASP, MWG-Biotech): 20 pmol/ul'lik stoktan, reaksiyon başına 50 pmol/ul olacak şekilde 2.5 ul eklendi.

5.2.3.1.1 Primerlerin baz dizisi

Nested PCR için Enomoto N. ve çalışma arkadaşlarının yaptığı araştırmada kullanılan primer dizisi seçildi(32). Seçilen primer dizisi, MWG-Biotech firması tarafından çalışmamızda kullanılmak üzere sentez edildi.

- 5'DSP:** 5'-TGG ATG GAG TGC GGT TGC ACA GGT A-3' (HCVJ nt/6703-6727)
- 3'DASP:** 5'-TCT TTC TCC GTG GAG GTG GTA TTG G-3' (HCVJ nt/7296-7320)
- 5'İSP:** 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAG GTA CGC TCC GGC GTG CA-3'
(HCVJ nt/6722-6741, altı çizili M13 forward primer dizisi ile birlikte)
- 3'İASP:** 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC GGG GCC TTG GTA GGT GGC AA-3'
(HCVJ nt/7275-7294, altı çizili M13 reverse primer dizisi ile birlikte)

5.2.3.2 1. PCR reaksiyonu ile amplifikasyon

RT-PCR ile elde edilen cDNA, 1.PCR reaksiyonu ile amplifiye edildi(201). Tek tüp için toplam 50 ul'lik 1.PCR reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 4). Pozitif ve negatif kontroller için ayrı birer reaksiyon karışımı oluşturuldu.

Tablo 4: 1.PCR reaksiyon karışımı

	İlk konsantrasyon	Kullanılan Miktar	Son Konsantrasyon
10X PCR tamponu	10X	5 ul	1X
3mM dNTP	3 mM	0.8 ul	0.048 mM
5'DSP	20 pmol/ul	2.5 ul	1 pmol/ul
3'DASP	20 pmol/ul	2.5 ul	1 pmol/ul
MgCl ₂	25 mM	5.0 ul	2.5 mM
Taq DNA polimeraz	5 U/ul	0.3 ul	0.03 U/ul
cDNA	20 ul	5.0 ul	2.0 ul
ddH ₂ O	—	28.9 ul	—

Hazırlanan karışıma termo cycler (Peltier effect , MJ Research PTC-100 , programmable thermal controller) cihazında, 1 dk 94 °C, 1dk 50 °C, 1dk 72 °C'de 45 döngü ve 72 °C'de 7 dk 'lık son uzama evresi ile amplifikasyon programı uygulandı.

5.2.3.3 2 PCR reaksiyonu ile amplifikasyon

1.PCR ile amplifiye olan DNA örneğinin, 2.PCR ile yeniden amplifikasyonu gerçekleştirildi(201). Tek tüp için toplam 50 ul'lık 2.PCR reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 5). Pozitif ve negatif kontrol için ayrı birer reaksiyon karışımı oluşturuldu.

Tablo 5: 2.PCR reaksiyon karışımı

	İlk konsantrasyon	Kullanılan Miktar	Son Konsantrasyon
10X PCR tamponu	10X	5 ul	1X
3 mM dNTP	3 mM	0.8 ul	0.048 mM
5'İSP	20 pmol/ul	2.5 ul	1 pmol/ul
3'İASP	20 pmol/ul	2.5 ul	1 pmol/ul
MgCl ₂	25 mM	5.0 ul	2.5 mM
Taq DNA polimeraz	5 U/ul	0.3 ul	0.03 U/ul
1.PCR ürünü	50 ul	2.0 ul	2.0 ul
ddH ₂ O	–	31.9 ul	–

Hazırlanan karışıma termo cycler (Peltier effect , MJ Research PTC-100, programmable thermal controller) cihazında, 1 dk. 94 °C, 1dk 50 °C, 1dk 72 °C'de 45 döngüde ve 72 °C'de 7 dk'lık son uzama evresi ile amplifikasyon programı uygulandı.

5.2.4 PCR ürününün agaroz jel elektroforezi

5.2.4.1 Çözeltilerin hazırlanması

Agaroz çözeltisi (Sigma A 9539): 0.6 gr agaroz tartıldı. 30 ml 0.5x Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu içinde erimesi için 1.5 dk mikrodalga fırında karıştırılarak eritildi.

RPMI 1640 (Serumsuz Ortam): 1 mg/ml konsantrasyonda bulunan stok solüsyon kullanıldı.

Etidyum Bromür (EtBr, Sigma E 7637): 20 mg EtBr, 20 ml RPMI 1640 solüsyonunda çözüldü. Küçük şişelerde 0.5 ml olacak şekilde alikotlandı. 0-10 °C'de saklandı.

Moleküler 8 Marker Hazırlanışı: 1 ul moleküler 8 marker (Böhringer Mannheim), 4 ul 0.5xTBE tamponu ve 1 ul loading (6X) tamponu eklenerek karıştırıldı.

5.2.4.2 Agaroz jel elektroforezinin uygulanması

Hazırlanan agaroz çözeltisine 2.5 ul etidyum bromür eklenerek karıştırıldı. Karışım jel tankına döküldü. 5-10 dk jelin soğuması beklendi. 1 ul jel yükleme tamponu ile 5 ul 2.PCR ürünü karıştırılarak jel kuyucuklarına yüklendi. Daha sonra moleküler 8 marker jel kuyucuğuna yüklendi. Elektroforez cihazında 45 dk, 100 voltta beklendi. Süre sonunda jel bantları Stratagene Eagle Eye II cihazında görüntülenerek fotoğraflandı.

5.2.5 PCR ürünlerinin dizilendirilmesi

Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD tarafından, Nested PCR ürünleri Big Dye Terminator kiti (ABI-USA) kullanarak floresan boya ile işaretlendi. Sense ve ayrıca antisense yönde, ABI PRISM 310 Genetic Analizörde POP6(1ml)E modülünde 61 cm'lik kapiller kullanılarak dizilendirildi. Sense ve antisense yönde primer ile elde edilen dizinin kendi içinde de kontrolü sağlandı.

5.2.5.1 Primerlerin baz dizisi

Sense yönde DNA dizi analizi için De Mitri M.S. ve çalışma arkadaşlarının yaptığı araştırmada kullanılan primer dizisi seçildi(202). HCV-PKR bağlanma bölgesinin dizi analizi için seçilen sense primer dizisi, MWG-Biotech firması tarafından çalışmamızda kullanılmak üzere sentez edildi. Antisense yönde DNA dizi analizi için ise Nested PCR'da kullanılan iç anti sense primer kullanıldı(32).

5' SP: 5'-ACC CCT CCC ACA TTA CAG CAG-3' (HCVJ nt/6859-6879)

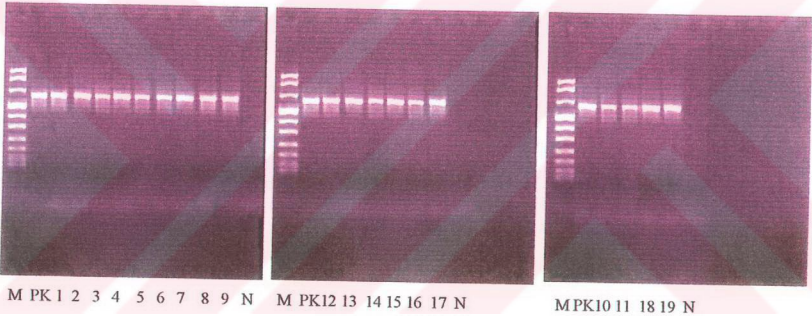
3' İASP: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC GGG GCC TTG GTA GGT GGC AA-3'
(HCVJ nt/7275-7294, altı çizili M13 reverse primer dizisi ile birlikte)

5.2.6 İstatistiksel analiz

Verilerin ortalaması, standart sapmaları ile birlikte hesaplandı. İstatistiksel analiz için parametrik olmayan Kruskal-Wallis varyans analizi yöntemi kullanıldı. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak için Bonferroni düzeltmesi ile Mann-Whitney U testi uygulandı. Mann-Whitney U testi sonucunda 2 uçlu p değerleri dikkate alındı.

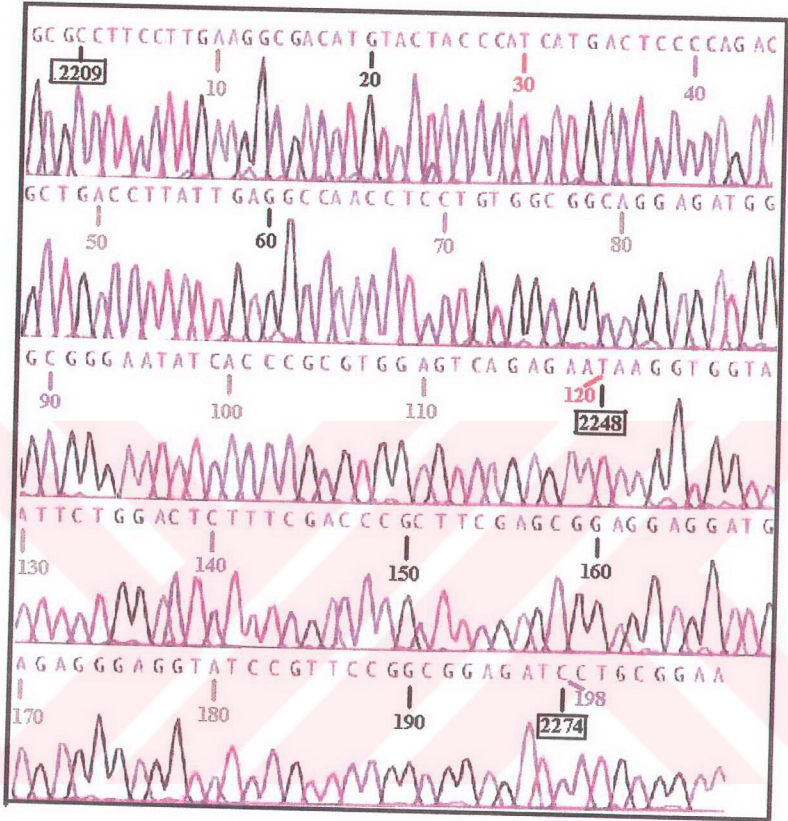
6. BULGULAR

Gereç ve yöntem bölümünde ayrıntısı yazılan sıra içersinde; DEÜ Tıp Fakültesi Gastroenteroloji bilim dalının klinik kayıtlarına ve DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD'nin laboratuvar verilerine göre değerlendirilerek çalışmaya alınan IFN+ Ribavirin tedavisi görmüş, kronik HCV genotip1b ile enfekte her bir hasta serumuna ait RNA elde edildi. Elde edilen RNA'lerden RT-PCR yöntemi ile cDNA'lar sentezlenerek, nested PCR reaksiyonu için kalıp olarak kullanıldı. HCV-PKR bağlanma bölgesinin amplifikasyonu için yapılan Nested PCR reaksiyon ürünü ve moleküler marker VIII (Bohringer Manheim), agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Bölgeye özgü 617 bp'lik bantlar gözlemlendi ve bulgular fotoğraflandı (Şekil5).



Şekil 5: 1-19 nolu hastalara ait PCR ürünlerinin agaroz jeli fotoğrafları

Nested PCR ile elde edilen HCV-PKR bağlanma bölgesi ürünleri kalıp alınarak, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD'da, Big Dye Terminator kiti (ABI-USA) ile PCR reaksiyonunda floresan boya işaretlemesi yapıldı. Ürünlerin DNA dizisi ABI 310 kapiller sistemde gerçekleştirildi. 1 nolu hastaya ait veri örnek olarak sunuldu (Şekil 6).



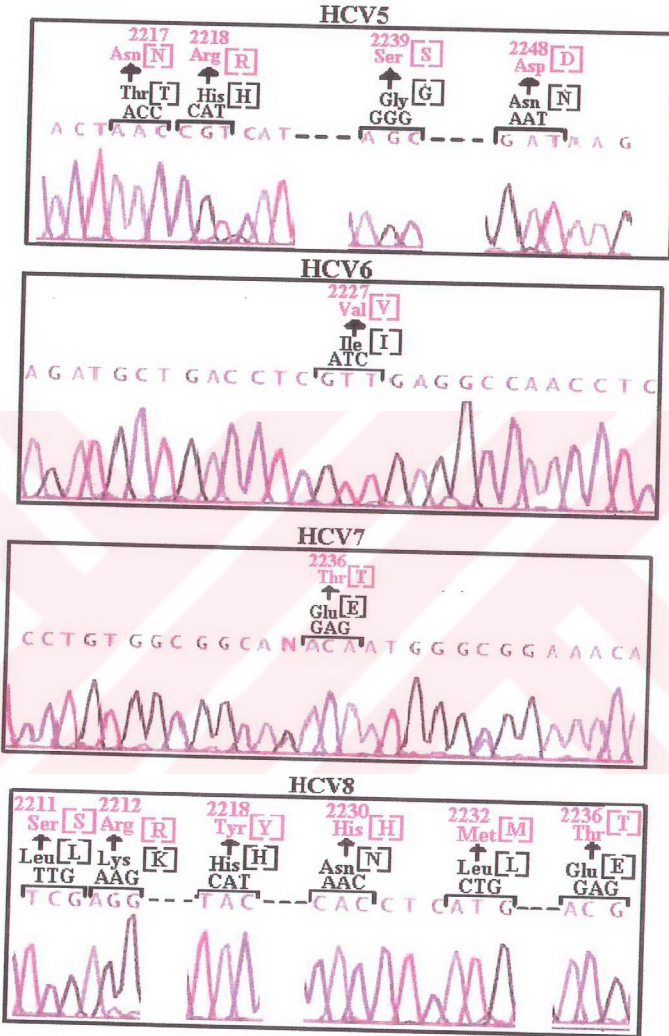
Şekil 6: HCV1 nolu hastanın DNA dizisi

Her bir hasta serumundan elde edilen HCV-PKR bağlanma bölgesine ait DNA dizisi, HCVJ suşu standart dizisiyle karşılaştırılarak mutasyonlar saptandı(203). Uluslar arası onaylanan aminoasit üçlü kod dizileri esas alınarak, mutasyonların yolaçtığı aminoasit değişimleri belirlendi(204). Mutasyon ve aminoasit değişimlerine ait bulgular birarada sunuldu (Şekil 7-12).

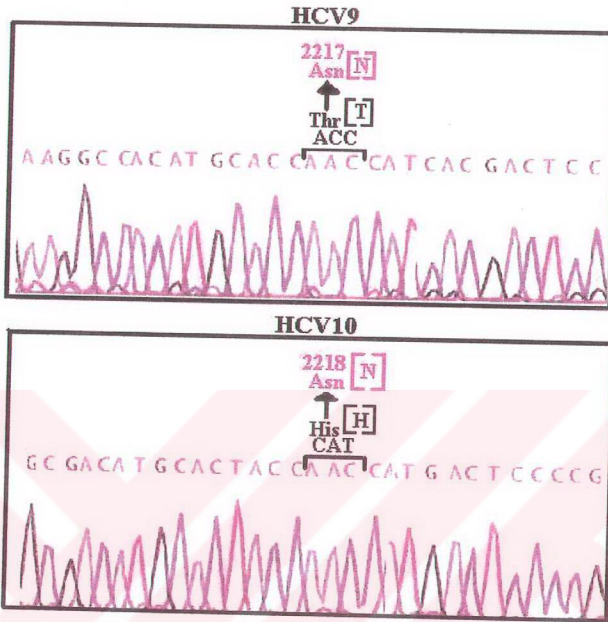
HCV-PKR bağlanma alanında toplam 86 aminoasit değişimi saptandı. Bu değişimlerden 14'ü (% 16) ISDR bölgesinde görülürken, 72'si (% 84) karboksi terminal bölgede yeraldı (Şekil 7-12). TYL hasta grubunda (HCV1-3); HCV-PKR bağlanma alanında görülen toplam 10 aminoasit değişiminin 10'unda (% 100) karboksi terminalinde yeraldı (Şekil 9). ISDR bölgesinde hiç aminoasit değişimi saptanmadı. BYL hasta grubunda (HCV4-8); toplam 33 aminoasit değişiminin 12'si (% 36) ISDR bölgesinde bulunurken 21'i (% 64) karboksi terminal bölgede saptandı (Şekil 7, 9-11). TYS hasta grubunda (HCV9-19); toplam 43 aminoasit değişiminin 2'si (% 4.7) ISDR bölgesinde, 41'i (% 95.3) karboksi terminal bölgede yeraldı (Şekil 8-12).

Çalışmamızda ISDR bölgesinde 2211., 2212., 2217., 2218., 2227., 2230., 2232., 2236., 2239., ve 2248. kodonlarda 14 aminoasit değişimi belirlendi (Şekil 7,8). Bu aminoasit değişimlerinden 12'si (% 86), BYL yanıtlu grupta bulunan 4 hastanın serum örneklerine ait ISDR bölgesinde meydana gelirken, 2'si (% 14) TYS yanıtlu hasta grubunda yeraldı. 2218. kodonda 3 ayrı hastada (His→Arg), (His→Tyr), (His → Asn) aminoasit değişimleri saptandı. Bu değişimlerden (His→Arg) ve (His→Tyr) BYL grubunda, (His→Asn) TYS grubunda meydana geldi. 1 BYL ve 1 TYS grubu hastasında 2217. kodonda (Thr→Asn) aminoasit değişimi bulunurken, 2 BYL grubu hastasında 2236. kodonda (Glu→Thr) aminoasit değişimi yeraldı. 2218., 2217. ve 2236. pozisyonların dışında kalan kodonlarda oluşan aminoasit değişimleri yalnızca birer hastada görüldü (Şekil 7).

Çalışmamızda karboksi terminal bölgesinde 2252., 2257., 2258., 2259., 2260., 2262., 2266., 2268 ve 2270. kodonlarda 72 aminoasit değişimi saptandı (Şekil 9-12) Bu aminoasit değişimlerinden 10'u (% 13.9) TYL hasta grubunda, 21'i (%29.2) BYL hasta grubunda, 41'i (% 56.9) TYS hasta grubunda meydana geldi. En çok aminoasit değişiminin görüldüğü kodonlar; 2259., 2262., 2268. ve 2270. kodonlardır. 2259. ve 2262. kodonlarda 19 hastada aminoasit değişimi görülürken, 2268. kodonda 14 hastada, 2270. kodonda 9 hastada aminoasit değişimleri belirlendi. 2252., 2257., 2258. kodonlarda 2 hastada aminoasit değişimi bulunurken, 2266. kodonda 4 hastada aminoasit değişimi görüldü. 2260. kodonda 1 hastada aminoasit değişimi görüldü. 2259. kodonda meydana gelen 19 aminoasit değişiminin 18'inde (Ile→Leu), 1'inde (Ile→Phe) dönüşümü görüldü (Şekil 9-12). 2262. Kodonda saptanan 19 aminoasit değişiminin 18'inde (Val→Glu), 1'inde (Val→Asp) dönüşümleri yeraldı (Şekil 9-12).

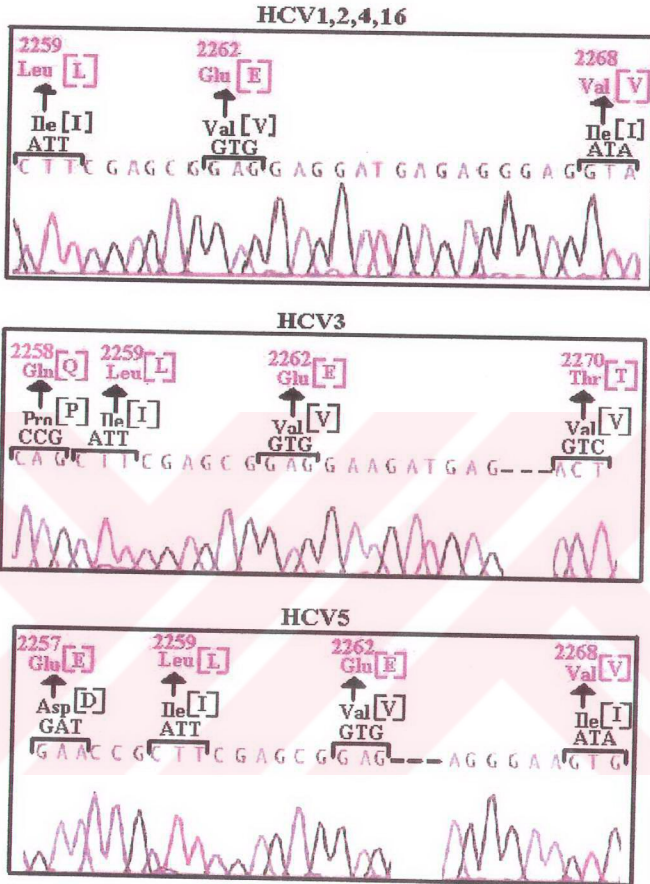


Şekil 7: HCV(5-8) nolu BYL grubu hastalarında ISDR (2209-2248) bölgesinin aminoasit değişimleri.

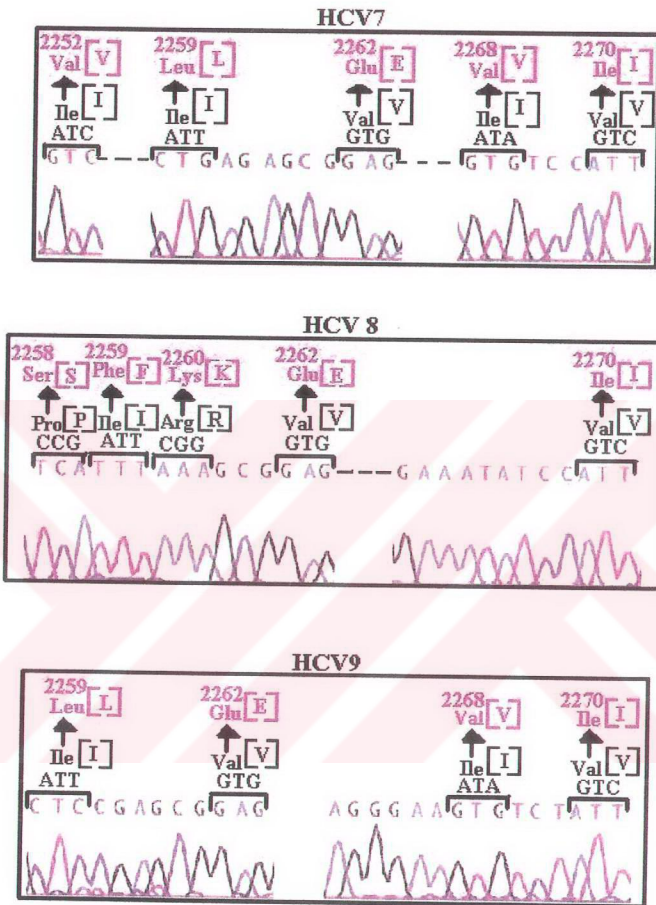


Şekil 8: HCV9 ve 10 nolu TYS grubu hastalarında ISDR (2209-2248) bölgesinin aminoasit değişimleri.

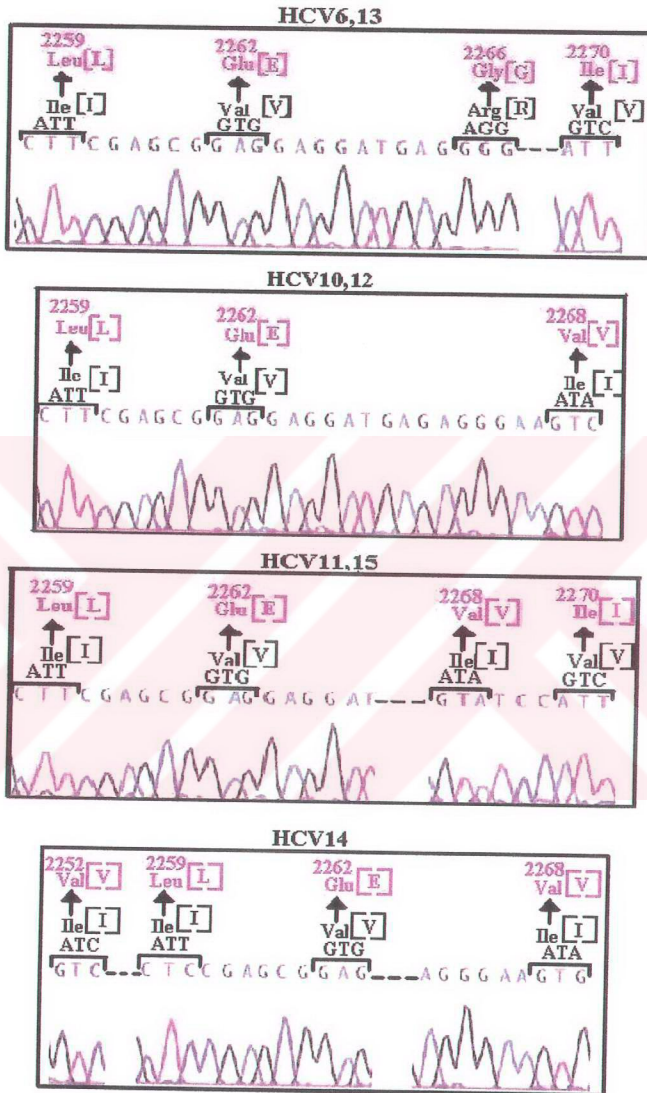
2268. kodonda yeralan 14 amino asit değişiminin hepsinde (Ile→Val) dönüşümü belirlendi (Şekil 9-12). 2270. kodonda bulunan 9 aminoasit değişiminin 8'inde (Val→Ile), 1'inde (Val→Thr) dönüşümü saptandı (Şekil 9-12). 2266. kodonda yeralan 4 aminoasit değişiminin tümünde (Arg→Gly) dönüşümü bulundu (Şekil 11,12). 2252. kodonda bulunan 2 aminoasit değişiminin 2' sinde de (Ile→Val) dönüşümü belirlendi (Şekil 10,11). 2257. kodonda görülen 2 aminoasit değişiminin 2' sinde de (Asp→Glu) dönüşümü yeraldı (Şekil 9,12). 2258. kodonda bulunan 2 aminoasit değişiminden 1' inde (Pro→Gln), diğerinde (Pro→Ser) dönüşümü saptandı (Şekil 9,10). 2260. kodonda görülen 1 aminoasit değişiminde (Arg→Lys) dönüşümü belirlendi (Şekil 10).



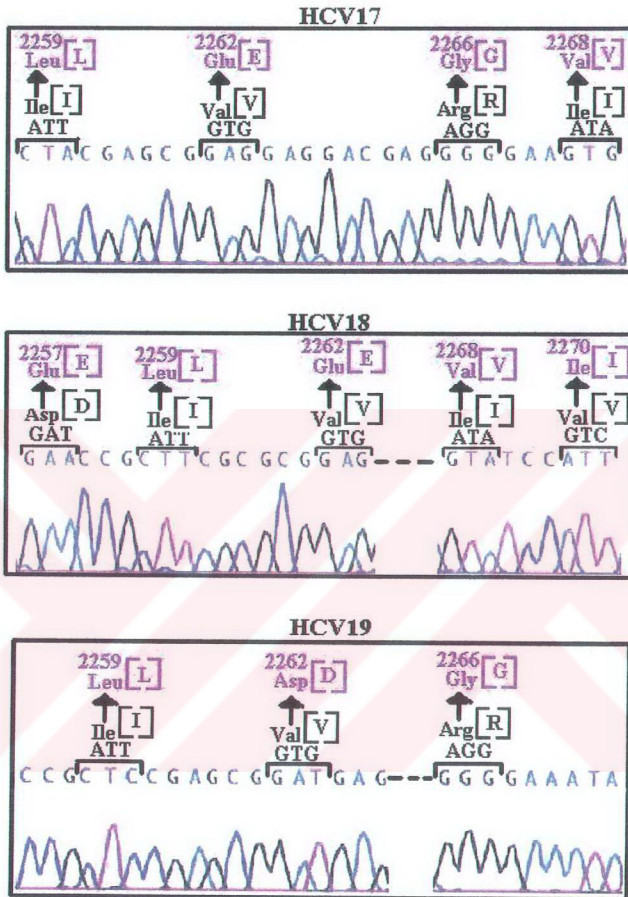
Şekil 9: HCV1-5 ve 16 nolu hastaların karboksil terminal (2248-2274) bölgesinde yer alan aminoasit değişimleri.



Şekil 10: HCV(7-9) nolu hastaların karboksi terminal (2248-2274) bölgesinde yer alan aminoasit değişimleri.



Şekil 11: HCV(6,10-15) nolu hastaların karboksi terminal (2248-2274) bölgesinde yer alan aminoasit değişimleri



Şekil 12: HCV(17-19) nolu hastaların karboksî terminal (2248-2274) bölgesinde yer alan aminoasit değişimleri.

Uluslararası kabul edilen HCV-PKR bağlanma bölgesi (HCVJ suşu) dizisi ve 19 hastada saptanan aminoasit değişimi toplu olarak değerlendirildi (Şekil 13).

PKR- bağlanma alanı		
2209	2248	
ISDR	Karboksi Terminal	
HCVJ	PSLKATCTTHHDSPADLIEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFDP IRAVEDEREISVPAEI	YAN
HCV1L..E.....V.....	TYL
HCV2L..E.....V.....	TYL
HCV3QL..E.....T.....	TYL
HCV4L..E.....V.....	BYL
HCV5NR.....S.....D.....E..L..E.....V.....	BYL
HCV6V.....T.....V.....L..E.....G..I.....	BYL
HCV7T.....V.....L..E.....V..I.....	BYL
HCV8	..SR.....Y.....H.M.....T.....SFK.E.....I.....	BYL
HCV9N.....L..E.....V..I.....	TYS
HCV10N.....L..E.....V.....	TYS
HCV11L..E.....V..I.....	TYS
HCV12L..E.....V.....	TYS
HCV13L..E.....G..I.....	TYS
HCV14V.....L..E.....V.....	TYS
HCV15L..E.....V..I.....	TYS
HCV16L..E.....V.....	TYS
HCV17L..E.....G..V.....	TYS
HCV18E..L..E.....V..I.....	TYS
HCV19L..D.....G.....	TYS

Şekil 13: HCV PKR-bağlanma bölgesinin (2209-2274) DNA dizi analizinin sonucunda belirlenen aminoasit dizileri (YAN:yanıt, BYL:biyokimyasal yanıt, TYS:tam yanıt, TYL: tam yanıt)

TYS (11, % 57.89), BYL (5, % 26.32) ve TYL (3, % 15.79) gruplarının ISDR bölgesi aminoasit değişimleri bulunduğundan sonra, Enomoto N.'in tanımladığı kriterlere göre (32), ISDR tipleri belirlendi. Belirlenen ISDR tiplerinde hasta gruplarının yüzdesel dağılımları incelendi (Tablo 6). Buna göre doğal tip viral ISDR ile 13 hastanın 9' u (% 69.23) tam yanıt, 1' i (% 7.69) biyokimyasal yanıt, 3' ü (% 23.08) tam yanıt. Orta tip viral ISDR ile 4 hastanın 2' si (% 50) tam yanıt, 2' si (% 50) biyokimyasal yanıt. Mutant tip viral ISDR ile 2 hastanın 2' side (% 100) biyokimyasal yanıt.

Tablo 6: Hasta gruplarının ISDR tiplerine göre yüzdesel dağılımları

YANIT	ISDR TİPİ		
	Doğal (n=13)	Orta (n=4)	Mutant (n=2)
TYS (% 57.89)	9 (% 69.23)	2 (% 50)	0
BYL (% 26.32)	1 (% 07.69)	2 (% 50)	2 (% 100)
TYL (% 15.79)	3 (% 23.08)	0	0

Hastaların yanıt tipi ile bazı klinik ve virolojik veriler karşılaştırıldı (Tablo 7).TYL, TYS ve BYL yanıtı hasta grupları arasında; cinsiyet ($p=0.605$), yaş ortalaması ($p=0.154$), toplam IFN dozu ($p=0.164$), toplam ribavirin dozu ($p=0.231$), Piecemeal nekroz ($p=0.152$), confluent nekroz ($p=0.247$), spotty nekroz ($p=0.207$), portal enflamasyon ($p=0.133$), HAI ($p=0.072$), fibrozis ($p=0.150$), PKR alanı aminoasit değişimi sayısı ($p=0.058$), karboksi terminal alanı aminoasit değişimi sayısı ($p=0.250$) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

Üç grup arasında ISDR aminoasit değişimi sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p=0.016$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak için Bonferroni düzeltilmesi ile Mann-Whitney U testi kullanıldı, Sonuç olarak, BYL grubunun ISDR aminoasit değişimi sayısı, TYS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklı bulundu ($p=0.012$). TYL ve TYS grupları arasında, ISDR aminoasit değişimi sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0.442$). BYL ve TYL grupları arasında da ISDR aminoasit değişimi sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0.055$).

Tablo 7: 19 hastanın bazı klinik ve virolojik özellikleri

Özellikler	YANIT TİPİ			P
	TYS	BYL	TYL	
Cinsiyet (K/E)	8/3	4/1	3/0	0.605
Yaş Ortalaması	52.45±6.19	54.20±6.30	48±2.00	0.154
Toplam IFN dozu (mu)	324.00±166.54	352.80±109.19	564±210.94	0.164
Toplam Ribavirin dozu (gr)	231.27±94.20	302.40±82.88	324±129.80	0.231
Karaciğer Histolojisi (Tedavi Öncesi)				
Piecemeal Nekroz	1.273±1.420	2.600±1.950	1.667±1.155	0.152
Confluent Nekroz	0.000±0.000	0.200±0.447	0.000±0.000	0.247
Spotty Nekroz	1.273±0.467	1.800±0.837	2.667±2.082	0.207
Portal Enflamasyon	2.818±0.982	3.000±1.225	4.000±0.000	0.133
Modifiye HAI	5.636±1.748	7.600±2.702	8.333±3.215	0.072
Fibrozis	2.000±1.265	1.400±0.548	2.667±0.577	0.150
ISDR alanı aminoasit değişimi sayısı	0.180±0.400	2.400±2.510	0.000±0.000	0.016
PKR alanı aminoasit değişimi sayısı	3.910±0.700	6.600±3.050	3.330±0.580	0.058
Karboksi terminal alanı aminoasit değişimi sayısı	3.730±0.650	4.200±0.840	3.330±0.580	0.250

7. TARTIŞMA

Araştırmada amaçlanan HCV-PKR bağlanma bölgesinin DNA dizi analizini gerçekleştirmek üzere hasta seçimi, serum sağlanması, DNA hazırlığı, amplifikasyon ve dizi analizi uygulamalarının tümünde uluslararası çalışma ölçütlerine uyuldu. Bu kapsamda hasta seçimi; Gastroenteroloji, Pataloji ve Mikrobiyoloji uzmanlarının birlikte kronik hepatit C enfeksiyonu olarak değerlendirdiği olgular arasından yapıldı. DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD'da, seçilen olguların serum örneklerinde anti-HCV, HbsAg, Hiv1,2 ve HCV RNA testleri uygulandı (Tablo 2). DEU Tıp Fakültesi Pataloji ABD tarafından olguların karaciğer biyopsi örnekleri ışık mikroskopunda, rutin hematoksilin-eozin düzeyinde masson-trikrom ve retikulin boyalarında kullanılarak modifiye HAI ile fibrozis evresi açısından değerlendirildi (Tablo 2). Tüm bu bulgular sonucunda, Gastroenterolojide kronik HCV tanısı konulan hastalar içinden, Avrupa standartlarına uygun olarak haftada 3 kez, 3-5 µg IFN α ve günde 1000-1200 mg ribavirin tedavisi alan olgular seçildi. IFN α +Ribavirin tedavisi sonrasında 6 aylık bir süreçte ALT ve HCV RNA test sonuçlarına göre hastalar TYS, TYL ya da BYL yanıtı olarak belirlendi (Tablo 2). Bu grup içinden çalışmaya dahil edilen 19 hastanın onaylarının alınmasından (Ek) ve araştırmaya etik kurulun uygundur raporu vermesinden sonra, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD laboratuvarında yapılan testlerle, virüsün bulunduğu saptanan ve genotip1b (RFLP ve Innolipa kiti) olduğu belirlenen serum örnekleri kullanıldı.

RNA eldesinden hedeflenen HCV-PKR bağlanma bölgesinin amplifikasyonu, ilgili yayınlarda uluslararası standartlarda uygulanan yöntemlerle gerçekleştirildi. Serumdan proteinaz K yöntemiyle RNA eldesi, buna bağlı olarak RT-PCR'la cDNA meydana getirilmesi ve nested PCR ile hedeflenen HCV-PKR bağlanma bölgesinin amplifikasyonu sonucu literatürde öngörülen 617 bp'lik bantlar elde edildi (Şekil 5). Literatürde belirtilen büyüklükte bantların elde edilmesi, çalışmada uygulanan deneylerin güvenilirliğini ortaya koymaktadır. Her bir hastaya ait 617 bp'lik HCV-PKR bağlanma bölgesinin amplifikasyon ürünü, sense ve ayrıca anti-sense primerlerle Big Dye Terminator kiti (ABI-USA) kullanılarak floresan boyayla işaretlendi. Ürünlerin ABI 310 kapiller analizatörde yürütülmesiyle DNA dizisi elde edildi (Şekil 6). HCV-PKR bağlanma bölgesinin sense ve antisense DNA dizi sonuçları biraraya getirildiğinde, üst üste çakışan bölgelerin uyumluluğu ile iç kontrol sağlandı. Ayrıca elde edilen DNA dizileri, HCVJ konsensus dizisi ile karşılaştırıldığında uyumlu olduğu gözlemlendi. Bu şekilde

doğruluğu saptanan DNA dizilerinde görülen farklılıklar mutasyonlar olarak belirlendi (Şekil7-12). Herbir hasta serumundan elde edilen, HCV-PKR bağlanma bölgesinin DNA dizilerinde, uluslar arası onaylanan aminoasit üçlü kod dizileri esas alınarak, mutasyonlara bağlı aminoasit değişimleri saptandı(204) ve tümü birlikte sunuldu (Şekil 13).

Sonuç olarak; HCV-PKR bağlanma bölgesinin içerdiği viral ISDR bölgesi ve karboksi terminal alanında saptanan mutasyonlara bağlı amino asit değişimleri ile hastaların IFN α +Ribavirin tedavisine verdikleri yanıtlar arasındaki ilişki, non-parametrik Kruskal Wallis analiz yöntemiyle değerlendirildi (Tablo 7). Çalışmada elde edilen önemli bir bulgu, BYL grubunun, ISDR bölgesinde bulunan aminoasit değişimleri ile ilişkisinin bulunmasıdır. ISDR bölgesi aminoasit değişimi sayısı, BYL hasta grubunda, TYS hasta grubuna göre anlamlı ölçüde daha yüksektir (p=0.012). TYL grubunda ISDR bölgesinde hiç aminoasit değişimi saptanmamasına rağmen, BYL grubu ile arasındaki amino asit değişiminin farklılığı, hasta sayısının az olmasından dolayı istatistiksel analizle desteklenmemiştir (p=0.055). TYL ile TYS hasta grupları arasında, ISDR bölgesi aminoasit değişimi sayısı açısından, anlamlı ölçüde büyük bir fark yoktur (p=0.442).

Araştırmada birinci bulguyu destekleyen ikinci önemli bir bulgu, ISDR tipi ile BYL yanıtının ilişkisi değerlendirildiğinde elde edildi. Bu bulguya göre orta tip (% 50) ve mutant tip (% 100) viral ISDR ile hastalarda biyokimyasal yanıtın görülme sıklığı, doğal tip viral ISDR (% 07.69)'ye göre daha fazladır (Tablo 6). Bir başka ifadeyle, orta ve mutant tip ISDR'ye sahip hastaların, IFN α +Ribavirin tedavisine biyokimyasal yanıt verme olasılıkları daha yüksektir.

Yunanistan'da Stratidaki, I. ve meslektaşlarının yaptıkları araştırma, bizim çalışmamızla uyumlu sonuçlar içermektedir. Araştırmada biyokimyasal yanıtla hasta grubunun aminoasit değişimleri sayısının, yanıtız olan gruba göre daha yüksek olduğu rapor edildi (p=0.003). Çalışmada 21 orta tip ISDR hastasının % 23' ün de ve 2 mutant tip ISDR hastasının % 100' ün de biyokimyasal yanıt alındığı yayınlandı. Ayrıca 2 virolojik yanıtla hastada, NS5A bölgesinde düşük bir mutasyon modelinin olmadığı rapor edildi(205).

Japonya'da Yoshioka, K. ve meslektaşlarının yaptıkları araştırmada bizim bulgularımız ile uyumlu sonuçlar görülmektedir. Çalışmada orta tip (% 53) ISDR ile hastaların doğal tip (%

20) ISDR`ye sahip HCV ile enfekte olanlara göre BYL yanıt hızlarının daha yüksek olduğu rapor edildi(206).

Çalışmamızda ISDR bölgesinin, 2211., 2212., 2217., 2218., 2227., 2230., 2232., 2236., 2239. ve 2248. kodonlarında belirlenen 14 aminoasit değişimi incelendiğinde en fazla değişimin 2218. kodonda meydana geldiği görülmektedir (Şekil 7,8). 2218. kodonda 3 ayrı hastada (His→Arg), (His→Tyr), (His→Asn) aminoasit değişimleri belirlendi. Bu değişimlerden (His→Arg) ve (His→Tyr) BYL grubunda, (His→Asn) TYS grubunda meydana geldi. 2218. kodondan sonra en fazla değişim 2217. ve 2236. kodonlarda görülmektedir. 2217. kodonda 2 ayrı hastada (Thr→Asn) aminoasit değişimi yer alırken, yine 2 ayrı hastada 2236. kodonda (Glu→Thr) aminoasit değişimi saptandı (Şekil 7,8). 2217. kodonda görülen (Thr→Asn) aminoasit değişimlerinden biri TYS grubunda bulunurken diğeri BYL grubunda meydana geldi. 2218., 2217. ve 2236. pozisyonların dışında kalan kodonlarda oluşan aminoasit değişimleri yalnızca birer hastada görüldü (Şekil 7,8).

Literatürde ISDR bölgesindeki aminoasit değişimleri ile bizim saptadığımız aminoasit değişimlerini birlikte değerlendirdiğimizde, Japonya ve Yunanistan`da yapılan çalışmalardan elde edilen bazı bulgular dikkati çekmektedir.

Japonya`da yapılan bir çalışmada Watanabe H. ve meslektaşları, NS5A ISDR bölgesindeki spesifik aminoasit değişimi ile IFN tedavisi yanıtlarının ilişkisini analiz ettiler. Araştırmada 2209., 2216. ve 2227. aminoasit kodonlarında meydana gelen substitüsyonların virolojik yanıtı hastalarda daha sık görüldüğü yayınlandı. Özellikle 2227. kodonda mutant tipte izolösin ile çoğunlukla valin (V) aminoasit değişiminin görüldüğü dikkati çekmektedir. Yayında ayrıca 2218. kodondaki histidin aminoasiti yerine yerleşen sisteinin virolojik yanıt ile birleştiği rapor edildi(33).

Japonya`da Yoshioka, K. ve meslektaşlarının yaptığı çalışmada, HCV genotip1b ile enfekte 62 hastanın 17`sinde, ISDR bölgesinde 2218. kodonda aminoasit değişimi meydana geldiği dikkati çekmektedir. Bu hasta grubu içinde bulunan 16 biyokimyasal yanıtı hastanın 6`sında 2218. kodonda (His→Arg) aminoasiti değişimi belirlenirken, 1`inde aynı kodonda (His→Asn) aminoasiti değişimi görüldü(206).

Yunanistan`da Stratidaki, I. ve meslektaşlarının yaptığı araştırmada, HCV genotip1b ile enfekte 28 hastanın 20`sinde, ISDR bölgesinde 2218. kodonda (His→Arg) aminoasit değişimi rapor edildi(205).

Çalışmamızın sonuçlarına göre elde edilen 3. bulgu; IFN α +Ribavirin tedavisine tam yanıtlılık ile ISDR bölgesi aminoasit değişimi sayısı arasında bir ilişki bulunamamasıdır. Tam yanıtlı (TYL) 3 hastanın ISDR bölgesi aminoasit değişimi sayısı 0`dır (Şekil 13). Bu sonuç ABD, Fransa ve İtalya`da yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyumludur. Çalışmalar da ISDR aminoait değişimi sayısı ile IFN tedavisine yanıtlılık arasında bir ilişki saptanmadı (37-42). Diğer taraftan bu çalışmaların tersine Japonya ve İspanya`da yapılan araştırmalarda, IFN tedavisi alan kronik HCV genotip1b hastalarında, virolojik yanıt ya da tam yanıt hızının, ISDR bölgesinde meydana gelen aminoasit değişimi sayısı ile ilişkili olduğu rapor edildi(32-36).

ISDR ve tedavi yanıtları arasındaki ilişkinin mekanizması, Amerikalı araştırmacı Gale, MJ Jr. ve meslektaşlarının, mayada NS5A proteininin fonksiyonu üzerine yaptığı araştırma ile açıklanabilir. Bu çalışmada viral NS5A`nın, protein kinaz katalitik domaini ile doğrudan etkileşime girerek PKR enzimini inhibe ettiği gösterildi. NS5A`nın PKR ile etkileşerek, inhibe etmesi için viral ISDR`nin gerekli olduğu rapor edildi(31). Sayfa 24`de PKR enzim fonksiyonu konusunda da anlatıldığı gibi PKR`nin inaktivasyonu, hücrede protein sentezinin devam etmesine yolaçar. Bu yol HCV`nin, IFN`un antiviral etkilerinden kaçmasında etken olabilir.

Gale, MJ Jr.; başka bir çalışmada, NS5A-PKR kompleks oluşumu için ISDR`nin yanısıra karboksi terminalinde yer alan 26 aminoasitlik bölgeninde gerekli olduğunu rapor etti. ISDR ile birlikte 26 aminoasitlik bölgeyi, PKR-bağlanma alanı olarak adlandırdılar. Çalışmada IFN`a dirençli HCV genotip 1b`ye ait NS5A`nın, in vivo PKR dimerizasyonunu engellediği gösterildi. PKR dimerizasyonunun bozulması ile kinaz enzim fonksiyonunun represe olduğu ve PKR-aracılıklı eIF2 α fosforilasyonunun engellendiği rapor edildi. Araştırmada memeli hücreleri ile mayada, NS5A-PKR etkileşimine ISDR mutasyonlarının engel olduğunun gösterilmesi, PKR-bağlanma alanında oluşan mutasyonlarında NS5A-PKR etkileşimini engelleyebileceğini akla getirmektedir(43). Bu yüzden çalışmamızda ISDR`nin karboksi terminalinde yer alan 26 amino asitlik bölgenin de, DNA dizi analizini gerçekleştirdik.

Ancak çalışmamızda elde ettiğimiz 4. bulgu; PKR-bağlanma alanında ve bu alanın kapsadığı 26 amino asitlik karboksi terminal bölgede meydana gelen aminoasit değişimleri ile tedavi yanıtları arasında bir ilişkinin bulunmamasıdır. TYS, BYL ve TYL grupları arasında, PKR ve karboksi terminalinde meydana gelen aminoasit değişimleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0.058$, $p=0.250$).

Avrupa'da Sarrazin, C. ve meslektaşlarının IFN'a dirençli bir diğer HCV suşu genotip 1a ile enfekte hastalarda yaptığı çalışmada, bizim bulguların tersine PKR-bağlanma alanı içinde meydana gelen aminoasit değişimlerinin, tedavi sonu ve sürekli virolojik yanıtı hastalarda yanıtı olmayanlara göre daha yüksek olduğu bulundu. Aynı çalışmada antiviral yanıt ile ISDR bölgesi aminoasit değişimlerinin ilişkili olmadığı rapor edildi(207).

Japonya'da Watanabe, H. ve çalışma arkadaşları genotip 1b subtipinde, karboksi uçta meydana gelen aminoasit değişimi sayısının, devam eden virolojik yanıtı hastalarda, geçici yanıtı hasta grubuna göre daha yüksek olduğunu yayınladılar. Bununla birlikte aynı çalışmada Sarrazin, C. ve meslektaşlarının tersine ISDR bölgesi aminoasit değişimlerinin, karboksi terminal bölgesine göre IFN etkisinde daha fazla etkili olduğu açıklandı(33).

Çalışmamızda karboksi terminal bölgede, en fazla aminoasit değişimi; 2259., 2262., 2268., 2270. ve 2266. kodonlarda görüldü. 2259. kodonda 19 hastanın tümünde meydana gelen aminoasit değişimlerinin 18'inde (Ile→Leu), 1'inde (Ile→Phe) dönüşümü saptandı (Şekil 9-12). 2262. kodonda 19 hastada saptanan aminoasit değişimlerinin 18'inde (Val→Glu), 1'inde (Val→Asp) dönüşümleri belirlendi (Şekil 9-12). 2268. kodonda yeralan 14 amino asit değişiminin hepsinde (Ile→Val) dönüşümü saptandı (Şekil 9-12). 2270. kodonda bulunan 9 aminoasit değişiminin 8'inde (Val→Ile), 1'inde (Val→Thr) dönüşümü saptandı (Şekil 9-12). 2266. kodonda yeralan 4 aminoasit değişiminin tümünde (Arg→Gly) dönüşümü belirlendi (Şekil 11,12).

PKR-bağlanma alanında yeralan karboksi terminal bölgede belirlediğimiz aminoasit değişimleriyle literatürde bu bölgede saptanan aminoasit değişimlerini karşılaştırdık. Japonya'da genotip 1b ile enfekte 23 Endonezyalı hasta üzerinde yapılan bir çalışmada; karboksi terminal bölgede (2248-2274) 2259. kodonda tüm hastalarda (Ile→Leu) değişimi saptandı. Ayrıca 2262. kodonda yine tüm hastalarda (Val→Glu) değişimi belirlenirken, 2268. kodonda 23

hastanın 14'ünde (Ile→Val) değişimi yeraldı.2271.kodonda 5 hastada (Pro→Ala), 4 hastada (Pro→Glu) aminoasit değişimi belirlediler(208).

Amerika`da yine karboksi terminal bölgede 9 HCV genotip 1b hastasında yapılan çalışmada bazı aminoait değişimleri belirlendi. Özellikle 2257., 2259., 2262., 2266. ve 2268. kodonlardaki aminoasit değişimleri dikkati çekmektedir. Çalışmada 2257. kodonda 5 hastada (Asp→Glu), 2259. kodonda tüm hastalarda Ile→Leu, 2262.kodonda yine tüm hastalarda Val→Glu, 2266. kodonda 2 hastada Arg→Gly, 2268. kodonda 3 hastada Ile→Val değişimleri rapor edildi(209).

Çalışmamızın sonuçlarına göre; IFN+Ribavirin tedavisi alan genotip1b ile enfekte kronik HCV hastalarında, ISDR bölgesi aminoasit değişimlerinin, biyokimyasal yanıt olasılığının tahmin edilmesinde önemli olduğu görülmektedir. Bundan sonra ISDR bölgesi aminoasit değişimleri, IFN+Ribavirin tedavisine biyokimyasal yanıtı olabilecek hastaların seçiminde, yararlı bir kriter olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte, biyokimyasal yanıtın ve ISDR bölgesi aminoasit değişimlerinin ilişkisinde etkili olası mekanizmaların açıklanması için moleküler düzeyde çalışmaların yapılması gerekmektedir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada DNA dizi analizi ile HCV-PKR bağlanma alanının mutasyonları saptandı ve IFN+Ribavirin tedavisi yanıtları arasındaki ilişkisi araştırıldı (Tablo 7). Araştırmada 86 aminoasit değişiminin 14'ü (% 16) ISDR bölgesinde, 72'si (% 84) bu bölgenin karboksi terminal alanında saptandı. ISDR'nin 14 aminoasit değişiminin 12'si (% 86) BYL grubunda belirlendi. Non-parametrik Kruskal Wallis varyans analiz yöntemiyle (Bonferroni düzeltmesi ile Mann-Whitney U testi uygulandı) BYL hasta grubunda ISDR bölgesi aminoasit değişimi sayısı, TYS hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p=0.012$). TYL grubunda ISDR bölgesinde hiç aminoasit değişimi saptanmamasına rağmen, TYL grubundaki hasta sayısının azlığından dolayı, BYL grubu ile arasında aminoasit değişimi sayısı farklılığı, istatistiksel olarak desteklenmemiştir ($p=0.055$). TYL ile TYS hasta grupları arasında ISDR bölgesi aminoasit değişimi sayısı açısından anlamlı ölçüde büyük bir fark yoktur ($p=0.442$).

Ayrıca çalışmanın sonuçlarına göre, orta tip (% 50) ve mutant tip (% 100) viral ISDR ile hastalarda biyokimyasal yanıtın görülme sıklığı, doğal tip viral ISDR'ye (% 07.69) göre daha fazladır (Tablo 6). Bu bulguya göre, orta ve mutant tip ISDR'ye sahip hastaların IFN α +Ribavirin tedavisine biyokimyasal yanıt verme olasılıklarının daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çalışmada PKR-bağlanma alanında ve bu alanın kapsadığı 26 amino asitlik karboksi terminal bölgede meydana gelen aminoasit değişimi sayısı ile tedavi yanıtları arasında bir ilişki bulunamadı. TYS, BYL ve TYL hasta grupları arasında, PKR bağlanma alanı ve karboksi terminalinde meydana gelen aminoasit değişimlerinin sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0.058$, $p=0.250$).

Bu bulgular, IFN+Ribavirin tedavisi alan genotip1b ile enfekte kronik HCV hastalarının biyokimyasal yanıt olasılığının tahmini için ISDR bölgesi aminoasit değişimlerinin önemli olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, kronik HCV hastalarının klinik tedavilerinde biyokimyasal yanıtın değerlendirilmesi için önemli bir bulgu olarak göz önünde bulundurulabilir. Diğer taraftan HCV-PKR bağlanma bölgesinde, Türkiye'de ilk kez saptanan aminoasit değişimlerinin literatüre önemli katkıları olacaktır. Bundan sonra, çalışmamızda standardize ettiğimiz moleküler yöntemlerle, Türkiye'de daha geniş bir popülasyonda daha fazla sayıda hasta serü-

mundan, HCV-PKR bağlanma bölgesinin analiz edilmesi önerilmektedir. Ayrıca biyokimyasal yanıtın ve ISDR mutasyonlarının ilişkisine ait mekanizmanın açıklanması için moleküler düzeyde araştırmaların yapılması gerekmektedir.



9. KAYNAK LİSTESİ

- 1- Report of a WHO consultation organized in collaboration with the viral hepatitis prevention Board, Antwerp, Belgium. Global surveillance and control of hepatitis C. *J. of Viral Hepat.* 1999; 6: 35-47.
- 2- Çakaloğlu Y. Hepatit C virüs enfeksiyonu: epidemiyoloji, patogenezi, klinik bulgular, tedavisi. *Viral Hepatit 94*. Kılıçturgay K. Basım 1994, İstanbul.
- 3- Gerberding JL. Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus and CMV among health personnel at risk for blood exposure; Final report from a longitudinal study. *J. Infect. Dis.*, 1994; 170: 1410-7.
- 4- Erden S, Buyukozturk S, Calangu S, Yilmaz G, Palanduz S, Badur S. A study of serological markers of hepatitis B and C viruses in Istanbul, Turkey. *Med Princ Pract.* 2003;12: 184-8.
- 5- Ozsoy MF, Oncul O, Cavuslu S, Erdemoglu A, Emekdas G, Pahsa A. Seroprevalences of hepatitis B and C among health care workers in Turkey. *J Viral Hepat.* 2003; 10:150-6.
- 6- Kara I. H., Yılmaz M.E., Sarı Y., Düzen S., Usul Y., Işıkoğlu B. Seroprevalence and risk factors of HCV in dialysis patients in a university. *Dialysis& Transplantation.* 2001; 30: 748-55.
- 7- Boschi-Pinto C., Stuver S., Okayama A., Trichopoulos D., Orav E.J., Tsubouchi H., and Mueller N. A follow-up study of morbidity and mortality associated with hepatitis C virus infection and its interaction with human T lymphotropic virus type I in Miyazaki, Japan. *Journal of Infect. Dis.* 2000; 181: 35-41.
- 8- Dolar E, Acar Y, Ateş KB. Kronik karaciğer hastalıklarında ve bazı risk gruplarında hepatit C virüs antikor prevalansı. *Gastroenteroloji* 1992; 3: 643-646.
- 9- Tuncer C., Özenürler S., Alkım H., Ünal S., Kandilci U. The role of hepatitis C infection in a cohort of patients with liver disease. *Gazi Medical Journal* 1995; 6: 109-112.
- 10- Alter HJ. To C or not to C: these are the questions. *Blood* 1995; 85: 1681-95.
- 11- Degos F. Natural history of hepatitis C virus infection. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: Suppl 4:16-8.
- 12- Busch MP. Insights into the epidemiology, natural history and pathogenesis of hepatitis C virus infection from studies of infected donors and blood product recipients. *Trans. Clin. Biol.* 2001; 8: 200-6.

- 13- Taylor DR., Shi ST., Lai MMC. Hepatitis C virus and interferon resistance. *Microbes and Infection*. 2000; 2: 1743-1756.
- 14- Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT) *Lancet* 1998; 352: 1426-32.
- 15- John G. McHutchison, Stuart C. Gordon, Eugene R. Schiff, Mitchell L. Shiffman, William M. Lee, Vinod K. Rustgi, Zachary D. Goodman, Mei-Hsiu Ling, Susannah Cort, Janice K. Albrecht, and The Hepatitis Interventional Therapy Group. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 1485 - 1492.
- 16- Feitelson MA. Hepatitis C Virus From Laboratory to Clinic. Part II 14. Vaccine research 2002; syf. 123
- 17- Negro F., Pacchioni D., Shimizu Y., Miller RH., Bussolati G., Purcell RH., and Bonino F. Detection of intrahepatic replication of hepatitis C virus RNA by in situ hybridization and comparison with histopathology. *PNAS* 1992; 89: 2247-2251.
- 18- Negro F., Giostra E., Krawczynski K., Quadri R., Rubbia-Brandt L., Mentha G., Colucci G., Perrin L., and Hadengue A. Detection of intrahepatic hepatitis C virus replication by strand-specific semi-quantitative RT-PCR: preliminary application to the liver transplantation model. *J. Hepatol.* 1998; 29: 1-11.
- 19- Krawczynski K., Beach M J., Bradley D W., Kuo G., di Bisceglie A M., Houghton M. Reyes GR., Kim J P., Choo Q L., Alter M J. Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: Immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology* 1992; 103: 622-629.
- 20- Ballardini G., Groff P., Giostra, F. Francesconi R., Miniero R., Ghetti S., Zauli D., Bianchi FB. Hepatocellular codistribution of c100, c33, c22, and NS5 hepatitis C virus antigens detected by using immunopurified polyclonal spontaneous human antibodies. *Hepatology* 1995; 21: 730-734.
- 21- Ahmed M.M., Shaw J.C., Elias E., Mutimer D.J. Isolation and culture of biliary epithelial cells (BEC) from explanted hepatitis C virus (HCV) infected liver. *J. Hepatology* 1995; 23: 97A.
- 22- Wang J.T., Sheu J.C., Lin J.T., Wang T.H., Chen D.S. Detection of replicative form of

- hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *J. Infect. Dis.* 1992;166: 1167-1169.
- 23- Quadri R., Rubbia-Brandt L., Abid K. and Negro F. Detection of the negative-strand hepatitis C virus RNA in tissues: implications for pathogenesis. 2001; 52: 161-171.
- 24- Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13: 223-235.
- 25- Kuo G., Choo Q.L., Alter H.J., Gitnick G.L., Redeker A.G., Purcell R.H. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.
- 26- Tobler LH, Busch MP. History of posttransfusion hepatitis. *Clin. Chem.* 1997; 43:1487-93.
- 27- Van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. *Lancet* 1994; 344: 1475-9.
- 28- Barrera JM, Francis B, Ercilla G, Nelles M, Achord D, Darner J, Lee SR. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. *Vox Sang* 1995; 68: 15-8.
- 29- Erensoy S. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. *Journal of Clinical Virology* 2001; 21: 271-281.
- 30- Sandres-Sauné K., Deny P., Pasquier C., Thibaut V., Duverlie G. and Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region, *J. Virol. Methods.* 2003; 109: 187-193.
- 31- Gale M.J., Korth M.J., Tang N.M., Tan S-L., Hopkins D.A., Dever T.E., Polyak S.J., Gretch D.R., Katze M.G. 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: 217-27.
- 32- Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y., Kurosaki M., Murakami T., Yamamoto C., Ogura Y., Izumi N., Marumo F., and Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5a gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N.Engl. J. Med.* 1996; 334: 77 - 82.
- 33- Watanabe H., Enomoto N., Nagayama K., Izumi N., Marumo F., Sato C. and Watanabe M. Number and position of mutations in the interferon (IFN) sensitivity determining region of the gene for nonstructural protein 5A correlate with IFN efficacy in hepatitis C virus genotype 1b infection. *The Journal of Infectious Diseases* 2001; 183: 1195-1203.

- 34- Chayama K., Tsubota A., Kobayashi M., Okamoto K., Hashimoto M., Miyano Y., Koike H., Kobayashi M., Koida I., Arase Y., Saitoh S., Suzuki Y., Murashima N., Ikeda K., Kumada H. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the Interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997; 25: 745-749.
- 35- Kurosaki M., Enomoto N., Murakami T., Sakuma I., Asahina Y., Yamamoto C., T Ikeda C., Tozuka S., Izumi N., Marumo F., Sato C. Analysis of genotypes and amino acid residues 2209 to 2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon-beta therapy *Hepatology* 1997; 25: 750-753.
- 36- Saiz J.C., Lopez Labrador FX., Ampurdanes S., Dopazo J., Fornis X., Sanchez Tapias J.M., Rodes J. The prognostic relevance of the nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotip1b and 3a isolates hepatitis C virus *The Journal of Infectious Diseases* 1998; 177: 839-847.
- 37- Khorsi H., Castelain S., Wyseur A., Izopet J., Canva V., Rombout A., Capron D., Capron J.P., Lunel F., Stuyver L. and Duverlie G. Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A 2209-2248 amino acid sequence do not predict the response to recombinant interferon-alfa therapy in French patients. *J. Hepatol.* 1997; 27: 72-77.
- 38- Squadrito G., Leone F., Sartori M., Nalpas B., Berthelot P., Raimondo G., Pol S., Brechot C. Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Gastroenterology* 1997; 113: 567-572.
- 39- Chung RT, Monto A, Dienstag JL, Kaplan LM. Mutations in the NS5A region do not predict interferon-responsiveness in american patients infected with genotype 1b hepatitis C virus. *J Med Virol.* 1999; 58: 353-8.
- 40- Pawlotsky JM., Germanidis G., Neumann AU., Pellerin M., Frainais P.O., and Dhumeaux D. Interferon Resistance of Hepatitis C virus genotype 1b: Relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J. Virol.* 1998; 72: 2795 - 2805.
- 41- Squadrito G., Orlando M.E., Cacciola I., Rumi M.G., Artini M., Picciotto A., Loiacono O., Siciliano R., Levrero M. and Raimondo G. Long-term response to interferon alpha is unrelated to "interferon sensitivity determining region" variability in patients with chronic hepatitis C virus-1b infection. *J. Hepatol.* 1999; 30: 1023-1027.
- 42- Squadrito G., Raffa G., Restuccia T., Pollicino T., Brancatelli S. and Raimondo G. Is investigation of hepatitis C virus NS5A gene heterogeneity a tool for predicting long-

lasting response to interferon therapy in patients with HCV-1b chronic hepatitis?

J Viral Hepat. 2002; 9: 360-9.

- 43- Gale M.J. Jr, Blakely C.M., Kwieciszewski B., Tan S.L., Dossett M., Tang N.M., Korth M.J., Polyak S.J., Gretch D.R., Katze M.G. Control of PKR protein kinase by the hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18: 5208-18.
- 44- Abacioglu YH, Davidson F, Tuncer S, Yap PL, Ustacelebi S, Yulug N, Simmonds P. The distribution of hepatitis C virus genotypes in Turkish patients. *J Viral Hepat.* 1995; 2: 297-301.
- 45- Cuthbert J.A. Hepatitis A: Old and new. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14: 38 - 58.
- 46- Mahoney F.J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12: 351 - 366.
- 47- Kılıçturgay K. Türkiye`de viral hepatitler. 1992; Kitap: Hepatit 92, 1-15.
- 48- World Health Organization. Viral Hepatitis Reposty of WHO scientific group. WHO Technical report series 512. 1973 Geneva: WHO.
- 49- Blumberg B.S. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *PNAS* 1997; 94: 7121-7125.
- 50- Blumberg B.S., Gerstley B.J.S., Hungerford D.A., London W.T., Sutnick A.I. A serum antigen (Australia antigen) in Down`s syndrome leukemia and hepatitis. *Ann. Int. Med.* 1967; 66: 924-931.
- 51- Prince A.M. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *PNAS* 1968; 60: 814.
- 52- Okochi K, Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang* 1968; 15 : 374-85.
- 53- Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1: 695-8.
- 54- Alter HJ, Houghton M. Clinical Medical Research Award. Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. *Nat Med* 2000; 6: 1082-6.
- 55- Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen-antibody system in Australia antigen-positive hepatitis. *Lancet* 1971; 2: 1225-7.
- 56- Purcell RH. Hepatitis Viruses: Changing patterns of human disease. *PNAS* 1994; 91:2401-2406.

- 57- Gust ID, Burrell CJ, Coulepis AG, Robinson WS, Zuckerman AJ. Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology* 1986; 25: 14-29.
- 58- Zhang YY. and Hansson BG. Introduction of a new hepatitis agent in retrospect: genetic studies of Swedish hepatitis D virus strains. *J.Clin.Microbiol.*1996; 34: 2713-2717.
- 59- Rizetto M., Canese M.G., Gerin J.L., London W.T., Sly D.L. and Purcell R.H. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J.Infect. Dis.* 1980; 141: 590-602.
- 60- Gudima S., Chang J., Moraleda G., Azvolinsky A. and Taylor J. Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *J. Virol.* 2002; 76: 3709 - 3719.
- 61- Caredda F, Rossi E, d'Arminio Monforte A: Hepatitis B virus-associated coinfection and superinfection with delta agent: indistinguishable disease with different outcome. *J.Infect. Dis.* 1985; 151: 925-8.
- 62- Hershow RC, Chomel BB, Graham DR, Schyve PM, Mandel EJ, Kane MA, Fields HA, and Hadler SC. Hepatitis D virus infection in Illinois state facilities for the developmentally disabled: Epidemiology and clinical manifestations. *Ann. Intern. Med.*1989;110:779-785.
- 63- Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (book). F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo, M.D. Summers. Springer-Verlag. Vienna, 1995.
- 64- Panda SK, Nanda SK., Zafrullah M., Ansari IH., Ozdener MH, and Jameel S. An Indian strain of hepatitis E virus (HEV): cloning, sequence, and expression of structural region and antibody responses in sera from individuals from an area of high-level HEV endemicity. *J.Clin.Microbiol.* 1995; 33: 2653 - 2659.
- 65- Tsarev SA., Emerson SU., Reyes GR., Tsareva TS., Letgers LJ., Malik IA., Iqbal M. and Purcell RH. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *PNAS* 1992; 89: 559-563.
- 66- Arankalle VA., Chadha MS., Tsarev SA., Emerson SU., Risbud AR., Banerjee K. and Purcell RH. Seroepidemiology of water-borne hepatitis in India and evidence for a third Enterically-Transmitted Hepatitis agent. *PNAS* 1994; 91: 3428-3432.
- 67- Heringlake S., Tillmann H.L. and Manns M.P. New hepatitis viruses. *J. Hepatol.*1996;

25: 239-247.

- 68- Simons JN., Pilot-Matias TJ., Leary TP., Dawson GJ., Desai SM., Schlauder GG., Muerhoff AS., Erker JC., Buijk SL., Chalmers ML., Sant CLV. and Mushahwar IK. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. PNAS 1995; 92: 3401-3405.
- 69- Muerhoff AS., Leary TP., Simons JN., Pilot-Matias TJ., Dawson GJ., Erker JC., Chalmers ML., Schlauder GG., Desai SM. and Mushahwar IK. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the flaviviridae associated with GB agent hepatitis. J. Virol 1995; 69: 5621 - 5630.
- 70- Madejón A., Fogeda M., Tomás J. F., Castillo I. and Carreño V. Absence of GBV-A and GBV-B sequences in human sera. J. Hepatol. 1998; 28: suppl:1, 184.
- 71- Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. Nature Med. 1995; 1: 564-569.
- 72- Leary TP., Muerhoff S., Simons JN., Pilot-Matias TJ., Erker JC., Chalmers ML., Schlauder GG., Dawson GJ, Desai SM., Mushahwar IK. Sequence and genomic organization of GBV-C: A novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. J. Med. Vir. 1996; 48: 60-67.
- 73- Linnen J., Wages J. Jr., Zhang-Keck ZY., Fry KE., Krawczynski KZ., Alter H., Koonin E., Gallagher M., Alter M., Hadziyannis S., Karayiannis P., Fung K., Nakatsuji Y., Shih JWK., Young L., Piatak M. Jr., Hoover C., Fernandez J., Chen S., Zou JC., Morris T., Hyams KC., Ismay S., Lifson JD. and Georg Hess. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. Science 1996; 271: 505-508.
- 74- Zuckerman AJ. Alphabet of hepatitis viruses. Lancet 1996; 347: 558-9.
- 75- Feinstone SM., Kapikian AZ., Purcell RH., Alter HJ. and Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. N. Engl. J. Med. 1975; 292: 767 - 770.
- 76- Stevens CE., Aach RD., Hollinger FB. Hepatitis B virus antibody in blood donors and the occurrence of non-A, non-B hepatitis in transfusion recipients: an analysis of the Transfusion Transmitted Viruses Study. Ann. Intern. Med. 1984; 101: 733-8.
- 77- Koziol DE., Holland PV., Alling DW., Melpolder JC., Solomon RE., Purcell RH., Hudson LM., Shoup FJ., Krakauer H., and Alter HJ. Antibody to hepatitis B core antigen as a

- paradoxical marker for non-A, non-B hepatitis agents in donated blood. *Ann. Intern. Med.* 1986; 104: 488-495.
- 78- Ezzell C. Candidate cause identified of non-A, non-B hepatitis. *Nature* 1988; 333: 195.
- 79- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- 80- Choo Q, Richman KH., Han JH., Berger K., Lee C., Dong C., Gallegos C., Coit D., Medina-Selby A., Barr PJ., Weiner AJ., Bradley DW., Kuo G. and M Houghton. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *PNAS* 1991; 88:2451-2455.
- 81- Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-1324.
- 82- Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y., Kurosaki M., Murakami T., Yamamoto C., Izumi N., Marumo F., Sato C. Comparison of full length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 224-230.
- 83- Florese RH., Nagano-Fujii M., Iwanaga Y., Hak Hotta RH. Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res.* 2002;90 : 119-131
- 84- Berdichevsky Y., Zemel R., Bachmatov L., Abramovich A., Koren,R., Sathiyamoorthy P., Golan-Goldhirsh A., Tur-Kaspa R., Benhar I. A novel high throughput screening assay for HCV NS3 serine protease inhibitors *Journal of Virological Methods.* 2003; 107: 245-255.
- 85- De Francesco R. Molecular virology of the hepatitis C virus. *J.Hepatol.* 1999; 31(Suppl:1): 47-53.
- 86- Dubuisson J., Penin F. and Moradpour D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends in Cell Biology* 2002; 12: 517-523.
- 87- Takikawa S., Ishii K., Aizaki H., Suzuki T., Asakura H., Matsuura Y. and Miyamura T. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J.Virol.* 2000; 74: 5066-5074.
- 88- Charloteaux B., Lins L., Moereels H. and Brasseur R. Analysis of the C-terminal membrane anchor domains of hepatitis C virus glycoproteins E1 and E2: toward a topological model. *J. Virol.* 2002; 76: 1944-1958.
- 89- Uchida M., Hino N., Yamanaka T., Fukushima H., Imanishi T., Uchiyama Y., Kodama T., Doi T. Hepatitis C virus core protein binds to a C-terminal region of NS5B RNA poly-

- merase. *Hepatology Research* 2002; 22: 297–306.
- 90- Stumpf M.P.H., Pybu O.G. Genetic diversity and models of viral evolution for the hepatitis C virus. *FEMS Microbiology Letter* 2002; 214: 143-152.
- 91- Carrère-Kremer S., Montpellier-Pala C., Cocquerel L., Wychowski C., Penin F. and Dubuisson J. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J.Virol.* 2002; 76: 3720–3730.
- 92- Yamaga AK. and Ou JH. Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J.Biol. Chem.* 2002; 277: 33228–33234.
- 93- Pieroni L., Santoloni E., Fipaldini C., Pacini L., Migliaccio G., and La Monica N. In vitro study of the NS2-3 protease of hepatitis C virus. *J.Virol.* 1997; 71: 6373–6380.
- 94- M. Pallaoro, A. Lahm, G. Biasiol, M. Brunetti, C. Nardella, L. Orsatti, F. Bonelli, S. Orrù, F. Narjes and C. Steinkühler. Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J. Virol.* 2001; 75: 9939-9946.
- 95- Wolk B., Sansonno D., Krausslich HG., Dammacco F., Rice CM., Blum HE., and Moradpour D. Subcellular localization, stability and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J.Virol.* 2000; 74: 2293–2304.
- 96- Masalova O. V., Lakina E. I., Abdulmedzhidova A. G., Atanadze S. N., Semiletov Yu.A., Shkurko T. V., Burkov A. N., Ulanova T. I., Pimenov V. K., Novikov V. V. Characterization of monoclonal antibodies and epitope mapping of the NS4 protein of hepatitis C virus. *Immunology Letters* 2002; 83: 187-196.
- 97- Kaneko T., Tanji Y., Satoh S., Hijikata M., Asabe S., Kimura K. and Shimotohno K. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 205: 320-326.
- 98- Tanji Y., Kaneko T., Satoh S. and Shimotohno K. Phosphorylation of hepatitis C virus encoded nonstructural protein NS5A. *J.Virol.* 1995; 69: 3980-3986.
- 99- Majumder M., Ghosh AK., Steele R., Ray R. and Ray RB. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53 dependent manner. *J.Virol.* 2001; 75: 1401-1407.
- 100- Asabe SI., Tanji Y., Satoh S., Kaneko T., Kimura K. and Shimotohno K. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J.Virol.* 1997 71: 790-796.

- 101- Reed KE., Xu J. and Rice CM. Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase. *J.Virol.* 1997; 71: 7187-7197.
- 102- Neddermann P., Clementi A. and De Francesco R. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *J.Virol.* 1999; 73: 9984-9991.
- 103- Ghosh AK., Majumder M., Steele R., Ray R. and Ray RB. Modulation of interferon expression by hepatitis C virus NS5a protein and human homeodomain protein ptx1. *Virology* 2003; 306: 51-59.
- 104- Brass V., Bieck E., Montserret R., Wolk B., Hellings JA., Blum HE., Penin F. and Moradpour D. An Amino-terminal amphipathic helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J.Biol. Chem.* 2002; 277: 8130-8139.
- 105- Lohmann V., Körner F., Dobierzewska A. and Bartenschlager R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J.Virol.* 2001; 75: 1437-1449.
- 106- Blight KJ., Kolykhalov AA. and Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290: 1972-974.
- 107- Shirota Y., Luo H., Qin W., Kaneko S., Yamashita T., Kobayashi K. and Murakami S. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J.Biol.Chem.* 2002; 277: 11149-11155.
- 108- Behrens SE, Tomei L. and De Francesco R. Identification and properties of the RNA dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 1996; 15: 12-22.
- 109- Qin W., Luo H., Nomura T., Hayashi N., Yamashita T. and Murakami S. Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 2132-2137.
- 110- Hwang SB., Park KJ., Kim YS., Sung YC. and Lai MMC. Hepatitis C virus NS5B protein is a membrane-associated phosphoprotein with a predominantly perinuclear localization. *Virology* 1997; 227: 439-446
- 111- Yamashita T., Kaneko S., Shirota Y., Qin W., Nomura T., Kobayashi K. And Murakami S. RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 15479 – 15486.

- 112- Ferrari E., Wright-Minogue J., Fang JWS., Baroudy BM., Lau JYN. and Hong Z. Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 1999; 73: 1649-1654.
- 113- Bartenschlager R. and Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* 2000; 81: 1631-1648.
- 114- Reigadas S, Ventura M, Sarih-Cottin L, Castroviejo M, Litvak S, Astier-Gin T. HCV RNA-dependent RNA polymerase replicates in vitro the 3' terminal region of the minus-strand viral RNA more efficiently than the 3' terminal region of the plus RNA. *Eur J Biochem.* 2001; 268: 5857-67.
- 115- Friebe P., Lohmann V., Krieger N. and Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J. Virol.* 2001; 75: 12047-12057.
- 116- Lim S.P., Khu Y.L., Hong W.J., Tay A., Ting A.E., Lim S.G., and Tan Y.H. Identification and molecular characterisation of the complete genome of a Singapore isolate of hepatitis C virus: sequence comparison with other strains and phylogenetic analysis. *Virus Genes.* 2001; 23: 89-95.
- 117- Pellerin C., Lefebvre S., Little MJ., McKercher G., Lamarre D. and Kukolj G. Internal initiation sites of de novo RNA synthesis within the hepatitis C virus polypyrimidine tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 295: 682-688.
- 118- Schuster C., Isel C., Imbert I., Ehresmann C., Marquet R. and Kieny MP. Secondary structure of the 3' terminus of hepatitis C virus minus-strand RNA. *J. Virol.* 2002; 76: 8058-8068.
- 119- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol. Biol.* 2001; 313: 451-64.
- 120- Leysen P., De Clercq E. and Neyts J. Perspectives for the treatment of infections with flaviviridae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13: 67 - 82.
- 121- Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology.* 1997; 26: (Suppl1): 15-20S.
- 122- Di Bisceglie AM. Hepatitis C. *Lancet.* 1998; 351: 351-355.
- 123- Lohmann V., Körner F., Koch J.-O., Herian U., Theilmann L. and Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;

285: 110 - 113.

- 124- Tellinghuisen TL. and Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Current Opinion in Microbiology*. 2002; 5: 419-427.
- 125- Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., Galli G., Falugi F., Petracca R., Weiner A. J., Houghton M., Rosa D., Grandi G. and Abrignani S. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 282: 938-941.
- 126- Agnello V., Abel G., Elfahal M., Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other Flaviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *PNAS* 1999; 96: 12766-12771.
- 127- Hepatitis C advances in hepatitis C: What is coming in the next 5 years? Locarnini SA and Bartholomeusz A.. *J.of Gastro. and Hepatol*. 2002; 17: 442-447.
- 128- Tsukiyama-Kohara K., Iizuka N., Kohara M. and Nomoto A.: Internal ribosome entry site within Hepatitis C virus RNA. *J. Virology*. 1992; 66: 1476-1483.
- 129- Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome binding mechanism. *J Virol*. 1993; 67: 3338-3344.
- 130- Pestova TV., Shatsky IN., Fletcher SP., Jackson RJ. and Hellen C.U.T. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes & Dev*. 1998; 12: 67 - 83.
- 131- Ito T., Tahara S.M. and Lai M.M.C. The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J. Virol*. 1998; 72: 8789-8796.
- 132- Naushad A. and Siddiqui A. Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J. Virol*. 1995; 69 : 6367 - 6375.
- 133- Naushad A. and Siddiqui A. The La antigen binds 5 noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *PNAS* 1997; 94: 2249-2254.
- 134- Hahn B., Kim Y.K., Kim J.H., Kim T.Y. and Jang S.K. HnRNP L interacts with the 3' border of internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J. Virol*. 1998; 72: 8782-8788.
- 135- Spångberg, K., Schwartz, S. PolyC binding protein interacts with the human hepatitis C

- virus 5' untranslated region. *J. Gen. Virol.* 1999; 80: 1371-1376.
- 136- Jacobson Brown P.M. and Neuman M.G. Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. *Clin. Biochem.* 2001; 34: 167-171.
- 137- Missale G, Bertoni R, Lamonaca V. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest.* 1996; 98: 706-714.
- 138- Zein N.N., Li H., Persing D.H. Humoral immunity in acute and chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 1999; 117: 510-510.
- 139- Shimizu Y.K, Hijikata M., Iwamoto A., Alter H.J., Purcell R.H. and Yoshikura H. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J. Virol.* 1994; 68: 1494-1500.
- 140- Farci P, Alter HJ, Wong DC. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *PNAS* 1994; 91: 7792-7796.
- 141- Rosa D., Campagnoli S., Moretto C., Guenzi E., Cousens L., Chin M., Dong C., Weiner A. J., Lau J.Y. N., Choo Q.L., Chien D., Pileri P., Houghton M. and Abrignani S. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: Cytoflorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *PNAS* 1996; 93: 1759-1763.
- 142- Weiner, A.J., Geysen H.M., Christopherson C., Hall J.E., Mason T.J., Saracco G., Bonino F., Crawford K., Marion C.D., Crawford K.A., Barr P.J., Miyamura T., McHutchinson J. and Houghton M. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoproteins: Potential role in chronic HCV infections. *PNAS* 1992; 89: 3468-3472.
- 143- Farci P., Shimoda A., Coiana A., Diaz G., Peddis G., Melpolder J. C., Strazzer A., Chien D. Y., Munoz S.J., Balestrieri A., Purcell R. H. and Alter H.J. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288: 339-344.
- 144- Kato N., Sekiya H., Ootsuyama Y., Nakazawa T., Hijikata M., Ohkoshi S. and Shimotohno K. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J. Virol.* 1993; 67: 3923-3930.
- 145- Farci P., Alter H.J., Wong D.C., Miller R.H., Govindarajan S., Engle R., Shapiro M. and

- Purcell R.H. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *PNAS* 1994; 91: 7792-7796.
- 146- P. Farci, A. Shimoda, D. Wong, T. Cabezon, D. De Gioannis, A. Strazzer, Y. Shimizu, M. Shapiro, H.J. Alter and R.H. Purcell. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein *PNAS* 1996; 93: 15394-15399.
- 147- Polyak S.J, Faulkner G, Carithers R.L, Corey L, Gretch D.R. Characterization of hepatitis C virus quasispecies heterogeneity by gel shift analysis: correlation with response to interferon therapy. *J. Infect. Dis.* 1997; 175: 1101-7.
- 148- Ferrari C., Valli A., Galari L. T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self limited hepatitis C infections. *Hepatology* 1994;19: 286-295.
- 149- Hoffmann R.M., Diepolder H.M., Zachoval R., Zwiebel F.M., Jung M.C., Scholz S, Nitschko H., Riethmuller G., Pape G.R. Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology.* 1995; 21: 632-8.
- 150- Botarelli P., Brunetto M.R., Minutello M.A., Calvo P., Unutmaz D., Weiner A.J., Choo Q.L., Shuster J.R., Kuo G., Bonino F. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993; 104: 580-587.
- 151- Koziel M.J., Dudley D., Afdhal N. Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J Virol* 1993; 67 7522-7532.
- 152- Koziel, M.J. HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 2311-2321.
- 153- Koziel M.J., Dudley D., Wong J.T. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol.* 1992; 149: 3339-3344.
- 154- Cerny A., McHutchison J.G., Pasquinelli C., Brown M.E., Brothers M.A, Grabscheid B., Fowler P. Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus derived peptide containing the HLA- A2.1 binding motif. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 521-530.
- 155- Battagay M., Fikes J., Di Bisceglie A.M., Wentworth P.A., Sette A., Celis E., Ching W.M., Grakoui A., Rice C.M., Kurokohchi K., Berzofsky J.A., Hoofnagle J.H., Feinstone

- S.M., Akatsuka T. Patients with chronic hepatitis C have circulating cytotoxic T cells which recognize hepatitis C virus encoded peptides binding to HLA-A2.1 molecules. *J. Virol.* 1995; 69: 2462-2470.
- 156- Kita H.,Moriyama T., Kaneko T.HLA B44-rusticated cytotoxic T lymphocytes recognizing an epitope on hepatitis C nucleocapsid protein. *Hepatology*1993; 18:1039-1044.
- 157- Erickson A.L., Houghton M., Choo Q.L.,Weiner A.J., Ralston R., Muchmore E.and CM. Walker. Hepatitis C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *J. Immunol.* 1993; 151: 4189-4199.
- 158- Nelson D.R., Marousis C.G., Davis GL., Rice C.M., Wong J., Houghton M. and Lau JY. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J. Immunol.* 1997; 158: 1473-1481.
- 159- Napoli J., Bishop G.A., McGuinness P.H., Painter D.M., McCaughan G.W. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; 24: 759-765.
- 160- Cerny A.,Chisari F.V.Pathogenesis of chronic hepatitis C: Immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999; 30: 595.
- 161- Boyer N. and Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J. Hepatol.* 2000; 32 (Suppl 1): 98-112.
- 162- Mark A. Feitelson. Hepatitis C virus From Laboratory to clinic. 2002; Part I 5.2 Immunopathology. Sayfa 69.
- 163- Tseng CTK.& Klimpel GR.Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 43-49.
- 164- Corado J.,Toro F., Rivera H., Bianco NE., Deibis L.,& De Sanctis JB. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection.*Clin.Exp. Immunol.* 1997; 109: 451-457.
- 165- Crotta, S. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 35-41.
- 166- Katze, MG. The war against the interferon-induced dsRNA-activated protein kinase: can viruses win? *J.Interferon Res.* 1992; 12: 241-248.
- 167- Robertson HD.,Manche L. and Mathews MB.Paradoxical interactions between human delta hepatitis agent RNA and the cellular protein kinase PKR. *J.Virol.*1996 70: 5611-5617.

- 168- Bischoff J.R., Samuel C.E. Mechanism of interferon action. Activation of the human P1/eIF-2 alpha protein kinase by individual reovirus s-class mRNAs: s1 mRNA is a potent activator relative to s4 mRNA. *Virology* 1989; 172: 106-115.
- 169- Elia, A. Regulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by RNAs encoded by a repeated sequence of the Epstein-Barr virus genome. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24: 4471-4478.
- 170- Taylor DR., Lee SB., Romano PR., Marshak DR., Hinnebusch AG., Esteban M., Mathews M.B. Autophosphorylation sites participate in the activation of the doublestranded RNA-activated protein kinase PKR. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16: 6295-6302.
- 171- Koromilas A.E., Cantin C., Craig A.W.B., Jagus R., Hiscott J. and Sonenberg N. The interferon-inducible protein kinase PKR modulates the transcriptional activation of immunoglobulin gene. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 25426-25434.
- 172- Zhang F., Romano P.R., Nagamura-Inoue T., Tian B., Dever T.E., Mathews M.B., Ozato K. and Hinnebusch A.G. Binding of double-stranded RNA to protein kinase PKR is required for dimerization and promotes critical autophosphorylation events in the activation loop. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 24946-24958.
- 173- Clemens, M. J., Elia A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interfer. Cyto. Res.* 1997; 17: 503-524.
- 174- Taylor DR., Shi ST., Romano PR., Barber G.N. and Lai MMC. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999; 285: 107-110.
- 175- Amoroso P, Rapicetta M, MEMA T. Correlation between virus genotypes and chronicity rate in acute hepatitis C. *J. Hepatol.* 1998; 28: 939-944.
- 176- Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, et al. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: National Surveillance Program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. *Ann. Int. Med.* 1999; 131: 174-181.
- 177- Shiratori Y., Kato N., Yokosuka O. Predictors of the efficacy of interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. Tokyo-Chiba Hepatitis Research Group. *Gastroenterology* 1997; 113: 558-566.
- 178- Neumann A.U., Lam N.P., Dahari H., Gretch D.R., Wiley T.E., Layden T.J. and Perelson A.S. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-therapy. *Science* 1998; 282: 103-107.
- 179- L. Chemello, Alberti A., Rose K. and Simmonds P. Hepatitis C serotype and response

- to interferon therapy. *N.Engl. J. Med.* 1994; 330: 143.
- 180- Zein N.N., Rakela J., Krawitt E.L., Reddy K.S., Tominaga T. and Persing D.H. Hepatitis C genotypes: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. *Ann. Int.Med.* 1996; 125: 634-639.
- 181- Greenlund AL., Farrar MA., Viviano BL. and Schreiber RD. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.* 1994; 13: 1591-1600.
- 182- Darnell J.E., Kerr I.M. and Stark G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264:1415-1421.
- 183- McOmish F., Yap P.L., Dow B.C., Follett E.A., Seed C., Keller A.J., Cobain T.J., Krusius T., Kolho E. and Naukkarinen R. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J.Clin. Microbiol.* 1994; 32: 884-892.
- 184- Noubaum JB., Pol S., Nalpas B., Landais P., Berthlot P., Brechot C. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann. Intern. Med.* 1995; 122: 161-168.
- 185- Takada N., Takase S., Takada A., Date T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J. Hepatol.* 1993; 17: 277-283.
- 186- Pawlotsky JM., Tsakiris L., Roudot-Thoraval F., Pellet C., Stuyver L., Duval J. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J. Infect. Dis.* 1995; 171: 1607-1610.
- 187- Chamberlain RW., Adams N., Saeed AA., Simmonds P. and Elliott RM. Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East. *J.Gen. Virol.* 1997; 78: 1341-1347.
- 188- Srivastava A.K. and Schlessinger D. Coregulation of processing and translation: Mature 5' termini of *E. coli* 23S rRNA form in polysomes. *PNAS* 1988; 85: 7144-7148.
- 189- Simmonds P., McOmish F., Yap PL., Chan SW., Lin CK, Dusheiko G., Saeed and Holmes EC. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J.Gen. Virol.* 1993; 74: 661-668.
- 190- De Lamballerie X., Charrel RN., Attoui H. and De Micco P. Classification of hepatitis C virus variants in six major types based on analysis of the envelope 1 and nonstructural

- 5B genome regions and complete polyprotein sequences. *J.Gen.Virol.* 1997; 78: 45-51.
- 191- Mellor J., Walsh E.A., Prescott L.E., Jarvis L.M., Davidson F., Yap P.L. and Simmonds P. Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based genotyping assay. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 417-423.
- 192- Simmonds P., Mellor J., Sakuldamrongpanich T., Nuchaprayoon C., Tanprasert S., Holmes E.C. and Smith D.B. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. *J.Gen.Virol.* 1996; 77: 3013-3024.
- 193- Tokita H., Okamoto H., Iizuka H., Kishimoto J., Tsuda F., Miyakawa Y. and Mayumi M. The entire nucleotide sequences of three hepatitis C virus isolates in genetic groups 7-9 and comparison with those in the other eight genetic groups. *J.Gen.Virol* 1998; 79: 1847-1857.
- 194- Alter MJ., Kruszon-Moran D., Nainan OV., McQuillan GM., Gao F., Moyer LA., Kaslow R.A. and Margolis H.S. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States. 1988 through 1994. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341: 556-562.
- 195- Feitelson M.A. Hepatitis C virus From Laboratory to Clinic. 2002; Part I 3. Epidemiology and transmission. Sayfa 44.
- 196- Thomas DL., Zenilman J., Shih JW., Alter HJ., Shepherd M., Carella A., Quinn TC. Evidence of sexual transmission of hepatitis C to females attending Baltimore sexually transmitted disease clinics-an analysis of 309 sexual partnerships. *J.Infect.Dis.* 1995; 171: 768-775.
- 197- Gross J.B. Hepatitis C: a sexually transmitted disease? *Am. J. of Gastro.* 2001; 96: 3051-3053.
- 198- Ishak KG, Baptista A, Bianchi L. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J. Hepatol.* 1995; 22: 696-699.
- 199- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2. Basım. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- 200- Gerard G.F. and D'Alessio I.M. *Methods in Molecular Biology.* 16 Humana Press. Totowa, N.J., 73-93, 1993.
- 201- Simmonds P. Polymerase Chain Reaction. In *Medical Virology; A practical Approach.* Edited by Desselberger U. Oxford: Oxford University Press; 1995, 107-145.
- 202- De Mitri M.S., Morsica G., Cassini R., Bagaglio S., Zoli M., Alberti A., Bernardi M.

- Prevalence of wild-type in NS5A-PKR protein kinase binding domain in HCV-related hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 2002; 36: 116–122.
- 203- Kato N., Hijikata M., Ootsuyama Y., Nakagawa M., Ohkoshi S., Sugimura T. and Shimotohno K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *PNAS* 1990; 87: 9524-9528.
- 204- Lodish H., Berk A., Zipursky SL., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. "Nucleic Acids, the Genetic Code and the Synthesis Macromolecules" *Molecular Cell Biology*. 4. Basım Chapter 4 syf. 118.
- 205- Stratidaki I., Skoulika E., Kelefiotis D., Matrella E., Alexandrakis G., Economou A. & Kouroumalis E. NS5A mutations predict biochemical but not virological response to interferon- treatment of sporadic hepatitis C virus infection in European patients. *Journal of Viral Hepatitis* 2001; 8: 243 –248.
- 206- Yoshioka K., Kobayashi M., Orito E., Watanabe K., Yano M., Sameshima Y., Kusakabe A., Hirofuji H., Fuji A., Kuriki J., Arao M., Murase K., Mizokami M. & Kakumuthe S. IFN Treatment group of affiliated hospitals of the third department of internal medicine at Nagoya University school of medicine. Biochemical response to interferon therapy correlates with interferon sensitivity-determining region in hepatitis C virus genotype 1b infection. *Journal of Viral Hepatitis* 2001; 8: 421– 429.
- 207- Sarrazin C., Berg T., Lee JH., Rüster B., Kronenberger B., Roth WK. and Zeuzem S. Mutations in the protein kinase binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response. *J. of Infect. Dis.* 2000; 181: 432-441.
- 208- Lusida MI., Nagano-Fujii M., Nidom Soetjipto CA., Handajani R., Fujita T., Oka K. and Hotta H. Correlation between Mutations in the Interferon Sensitivity-Determining Region of NS5A Protein and Viral Load of Hepatitis C Virus Subtypes 1b, 1c, and 2a. *J of Clin. Micro.* 2001; 39: 3858-3864.
- 209- Nousbaum J.-B., Polyak SJ., Ray SC., Sullivan DG., Larson AM., Carithers Jr. RL. and Gretch DR. Prospective Characterization of Full-Length Hepatitis C Virus NS5A Quasi-species during Induction and Combination Antiviral Therapy. *J. Virol.* 2000; 74: 9028-9038.

10. EK

Gönüllü Bilgilendirilmiş Onay Formu

Bu çalışmada; kronik hcv teşhisi konulan IFN+Ribavirin tedavisi almış, hcv genotip1b ile enfekte hastaların serum örnekleri kullanılacaktır. Hepatit C virüs genomunun interferona hassasiyeti belirleyici bölgesinde (ISDR), mutasyon araştırması planlanmaktadır. Japonya, İtalya ve İspanya` da aynı amaçla yapılan çalışmalarda, tedaviye yanıt ile ISDR bölgesinde saptanan mutasyonlar arasında ilişki saptandığı rapor edilmektedir. Planladığımız çalışmanın, kronik HCV hastalarının tedavisinin yönlendirilmesinde yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Planlanan yüksek lisans tez projesi Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim dalında, Prof. Dr. Orhan Terzioğlu ve Prof. Dr. Hakan Abacıoğlu başkanlığı ve danışmanlığında, Araştırma Görevlisi Nevim Aygün ile birlikte yürütülmektedir. Çalışmada viral RNA` nın mutasyon analizi, uluslar arası standartlara uygun olarak yapılacaktır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim dalında, size kronik HCV teşhisi konulduğu, IFN+Ribavirin tedavisi aldığımız ve genotip1b ile enfekte olduğunuz belirlendi. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın olgu grubu için uygun görülmektesiniz.

Tedavi sırasında rutin çalışma için verdiğiniz serum örneğiniz, DEU Mikrobiyoloji laboratuvarında uygun koşullarda saklandı. Biz saklanan serum örneğinizi kullanmak için iznini istiyoruz. Sizden yeniden kan örneği alınmayacaktır. Çalışma için hiçbir ücret ödemeyeceksiniz. Elde edilen sonuçlar hakkında, doktorunuza ve size bilgi verilecektir. Gerek gördüğünüzde araştırmacılara ulaşabilirsiniz. Çalışmaya katılma tamamen isteğe bağlıdır.

Kabul ediyorum / etmiyorum

Adı ve soyadı:

Doktorun Adı Soyadı:

Adresi:

İmzası :

İmzası :

YARISGENETİM KURUMU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ