

Hepatit C Virüs Genotiplerinin Klinik Önemi

*Uzm. Dr. Fatih Yüksel IŞIKSAL**

Hepatit C virüsü (HCV), son dönem karaciğer hastalığının en sık sebebidir ve hepatoselüler karsinoma (HCC) ile yakından ilişkilidir. HCV ile enfeksiyon özellikle gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere tüm dünyada yaygındır ve kronik hepatit C enfeksiyonu halk sağlığı ve ekonomik açıdan önemli bir problemdir. HCV'nü üretmek için uygun bir hücre kültürü henüz bulunamadığından virüsle ilgili bilgiler ileri gen teknolojisi sayesinde mümkün olmaktadır. Yapılan genomik sekanslama çalışmalarında virüsün birçok farklı genotipe sahip olduğu görülmüştür. HCV genomu üzerindeki her bir genetik elemanın uzunluğu farklı genotiplerde değişiktir. Uzun dönemde yapılan klinik çalışmalar göstermiştir ki, farklı genotipler arasında hastalık derecesi, antiviral tedaviye cevap oranı ve virüs-konak ilişkisi açısından önemli farklılıklar vardır. Bu nedenle, HCV'nün tip ve subtiplerinin saptanması, uygulanan tedaviye alınan yanıtın değerlendirilmesini sağlamakla beraber HCV'ne karşı bir aşı geliştirilmesi için yapılan araştırmalara da ışık tutacaktır.

1960'lı yıllarda hepatit B virüsü ve 1970'li yıllarda hepatit A virüsü bulunarak bunlara özgü antijenik yapılar belirlenmiştir. Bu tarihlerde transfüzyonla bulaşan bazı tip hepatitlerin olabileceği ve bunların kuluçka sürelerinin daha uzun olduğu fark edilmişti. O yıllarda buna non-A non-B hepatiti (NANBH) adı verilmişti. 1974 yılında, post-transfüzyon hepatiti gelişmiş olan 51 hastanın 36'sında hepatit B virüsü için hiçbir antijen ya da antikör pozitifliği saptayamayan Prince ve arkadaşları tarafından bu hastalık için Hepatit C adı önerilmişse de taraftar bulmamıştır¹. 1989 yılında Choo ve arkadaşları rekombinant cDNA tekniği kullanarak, kontamine faktör-VIII konsantresi ile deneysel olarak enfekte edilmiş şempanzelerden bir viral genom klonladılar ve buna Hepatit C Virüsü (HCV) adını verdiler².

*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı, ADANA

Rekombinant bir epitopa karşı dolaşan antikorların belirlenmesi temeline dayanan testlerin geliştirilmesi ile HCV'nün transfüzyon sonrası non-A non-B hepatitlerinin en sık nedeni olduğu kanıtlandı. Aach ve arkadaşları post-transfüzyon non-A non-B hepatiti gelişen 115 vakanın % 91'inde sebebi HCV olarak saptadılar³.

Bundan sonra HCV'nün biyolojisi, epidemiyolojisi ve patofizyolojisi hakkındaki bilgiler hızla arttı ve tüm dünyada HCV'nün transfüzyon sonrası ve toplumdan kazanılan non-A non-B hepatitlerinin ve daha önce kriptojenik olarak sınıflanmış olan sirozların en sık nedeni olduğu anlaşıldı⁴. Ayrıca, HCV enfeksiyonunun sıklıkla kronik hepatit B enfeksiyonuna eşlik edebileceği, dot-blot hibridizasyon ile HBV-DNA negatif olan vakalarda HBV-HCV ko-enfeksiyonu daha sık görülebileceği ve HCV'nün HBV'ne eşlik ettiği vakalarda karaciğer hastalığının daha ciddi seyrettiği de gösterildi⁵.

HCV, bir RNA virüsüdür. Henüz HCV' nü üretmek için uygun bir hücre kültürü bulunamamıştır. İn vivo çalışmalar için uygun olan tek hassas hayvan şempanzedir⁶. Hepatit C virionu esansiyel lipidler içerir ve muhtemelen flavivirüs ve pestivirüsler gibi zarflıdır. Filtrasyon çalışmalarından anlaşıldığına göre enfeksiyöz ajan 30-60 nm çapındadır. Bazı yazılarda HCV virüs-benzeri parçacıkların çapı 55-65 nm olarak belirtilmişse de, bu küçük ölçüm farkları HCV parçacığı ile ilişki içinde olan immunoglobulinler ya da lipoproteinler nedeniyle olabilir^{7,8}.

İleri gen teknolojisinin kullanımı ile HCV'nün karakterizasyonu mümkün olmuştur. HCV, yaklaşık 10 kilobazlık pozitif sarmallı bir RNA virüsüdür. HCV'nün proteinleri post-translasyonel bir süreç ile bir polipeptid prekürsöründen oluşurlar⁹. Tüm genom yaklaşık 9400-9500 nükleotidden oluşur, yapısal olan ve yapısal olmayan bölgeler içeren yaklaşık 3010 aminoasit uzunluğunda bir polipeptidi kodlayan tek bir tane açık okuma çatısı (open reading frame)(ORF) içerir. Bu ORF 9030 nükleotidden oluşur ve 330. nükleotiddeki ilk ATG'de başlar. ORF, 5' ucundaki 329 nükleotid ve 3' ucundaki 54 nükleotid hariç olmak üzere tüm RNA boyunca uzanır¹⁰. Tüm izolatlarda, 5' ucunda oldukça iyi korunan bir kodlanmayan bölge (non-coding

region) (NCR) bulunur. 5' NCR ucu 329 bp, 3' NCR ucu ise 54 bp uzunluğundadır. 5' NCR ucu birçok çatiçi sonlandırma kodonu içerir. 5' ve 3' NCR uçları, muhtemelen genomun replikasyonunda rol oynayan birçok direk ve tersine çevrilmiş tekrarlar içerirler^{11,12}. HCV'nün genomu flavivirüsler ve pestivirüsler ile önemli bir homoloji gösterir. Birincisi; HCV ile flavivirüsler ve pestivirüslerin kodladıkları poliproteinlerin boyutları yakındır (sırasıyla; 3011, 3400 ve 4000). İkincisi, flavi- ve pestivirüslerin yapısal proteinleri, küçük, basit bir nükleokapsid proteini ile başlayan poliproteinlerinin N ucunda yerleşmiştir. HCV poliproteinini de N ucunda oldukça basit ve küçük bir bölge içerir ki 22-kDa'lık muhtemel bir nükleokapsid proteinini kodladığı düşünülmektedir. Ayrıca, replikaz bölgesi her üç viral poliproteinde de C ucunda bulunur. Dahası HCV, pestivirüs ve flavivirüs poliproteinlerinin hidrofobik karakterleri belirgin olarak benzerdir¹³. HCV ile Japon ensefalit virüsü (JEV) arasında yapısal proteinler ya da NS1, NS2 ve NS4 gibi yapısal olmayan proteinler açısından benzerlik yoktur. Anlamlı bir homoloji sadece NS3 ve NS5 proteinlerinde saptanmıştır. Bu yüzden HCV flavivirüslerle pestivirüslerin ortasındadır ve flaviviridae ailesinin yeni bir üyesi olarak sınıflandırılmaktadır¹¹.

HCV ile flavivirüsler arasındaki sekans benzerliklerine dayanılarak HCV proteinin tahmini ayrılma bölgeleri belirlenmiştir. Ancak HCV proteinlerinin oluşumu konusunda çok az bilgi olduğundan bu ayrılma bölgelerinin tayini bilgisayar analizleriyle yapılmıştır. Yine de kodlanan proteinlerin hidrofobisite profilleri ile birlikte kıyaslandığında HCV ile JEV'nün yapısal olmayan proteinleri arasında belirgin benzerlik bulunmuştur. Japon ensefalit virüsü (JEV), Sarı humma virüsü ve dang humması virüsü gibi flavivirüslerin RNA genomları büyük bir poliproteini kodlar. Bu poliprotein daha sonra üç yapısal proteine [core proteini(C), daha sonra matrix proteinine (M) dönüşen prematrix proteini (pre-M) ve zarf proteini (E)] ve yedi adet yapısal olmayan proteine (NS1, NS2a,NS2b, NS3, NS4a,NS4b VE NS5) ayrılır. Yapısal proteinlerin viral partikülleri oluşturduğu, yapısal olmayan proteinlerin ise viral

genomun replikasyonu ile alakalı olduğu düşünülmektedir. NS3 bölgesinin ekspresse ettiği protein bir helikaz, NS5 bölgesinin ekspresse ettiği protein ise bir RNA bağımlı RNA polimerazdır¹¹.

Genetik elemanların organizasyonu 5' ucundan 3' ucuna doğru şu şekildedir: 5'NCR, C, E1, E2/NS1, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b ve 3'NCR¹⁴.

Bu tahminlere göre; C proteini 114 aminoasit içerir ve 13000 dalton ağırlığındadır, yüksek bir arginin-lisin içeriği vardır (%23.5) ve RNA genomuna bağlanabilir. Tahmini E proteini, 198 aminoasit uzunluğunda ve 21400 dalton ağırlığındadır ve hidrofobik C-terminali konak membranı ile etkileşebilir. Tahmini NS1 proteini 340 aminoasitten oluşur ve 38000 dalton ağırlığındadır. HCV NS1 bölgesi flavivirüslerinkine benzer şekilde dokuz glikozilasyon bölgesine sahiptir. Tahmini NS2 proteini 277 aminoasit , NS4 proteini ise 398 aminoasit uzunluğundadır. NS3, 609 aminoasit uzunluğunda ve muhtemelen bir helikazdır. NS5 ise 997 aminoasit uzunluğunda ve muhtemelen bir RNA bağımlı RNA polimerazdır.

NS3 ve NS5 tüm flavirüslerde hatta bazı başka virüslerde bile iyi korunmuştur. Flavivirüslerin ve poliovirüsünün NS5'i de dahil olmak üzere tüm RNA bağımlı RNA polimerazlarda Gly-Asp-Asp (GDD) sekansı vardır. Bu sekans HCV'nün tahmini NS5'inde de vardır (2736-2738. aminoasitler)¹¹.

HCV genomik organizasyonu bakımından ciddi bir heterojenite gösterir. Heterojenitenin derecesi genomun her bir bölgesi için değişiktir^{15,16}.

HCV, kronik enfekte şempanzelerde yıllık yaklaşık 1.44×10^{-3} baz yer değişimi hızında mutasyona uğrar. Buna göre basit bir hesapla, eğer şempanze 700 yıl yaşarsa HCV genomundaki tüm nükleotidlerin değişeceği söylenebilir. E2/NS1 bölgesinin amino ucundaki hypervariable region 1 (HRV-1) missense mutasyonların en sık görüldüğü bölgedir^{14,15}.

HVR-1, tahmini E2 glikoproteininin 384-414 numaralı aminoasitleri arasında yer alır. Bu bölgede en az bir tane immünodominant kodlama bölgesi gösterilmiştir. Bu bölgedeki aminoasit sekans değişikliklerinin hastalarda ikinci bir hepatit atağına neden olduğu bilinmektedir. İlk hepatit

atağı sırasında oluşan antikorlar değişmiş olan peptidi tanımamakta ve ikinci hepatit atağı ortaya çıkmaktadır. Tahmini konsensüs aminoasitlerinden kodon 385 (threonine), 406 (glycine), 409 (glutamine) ve 413 (leucine)'de alıcı ile verici arasında değişiklik görülmemesi bu bölgede bir konaktan diğer bir konağa geçiş sırasında kısmi bir stabilitenin var olduğunu düşündürmüştür. HVR tahmini yapısal protein üzerinde yer aldığı için sekans varyasyonları, interferona yanıt gibi önemli klinik farklılıklara neden olabilir⁶.

Variabilitenin mekanizması net olarak bilinmemektedir. Diğer RNA virüslerinin antijenik değişimleri göz önüne alınırsa evrimsel bir mekanizma düşünülebilir. Muhtemelen küçük bir antijenik değişiklik bile güçlü bir seleksiyona neden olmaktadır¹⁷. Diğer taraftan, hipervariabilite selektif immün baskı nedeniyle oluşmaktadır. Eğer predominant E2 hypervariable epitop spesifik antikorlarla nötralize edilirse, mutasyonlar kaçak mutantlara neden olabilir. Bu mutantlar yeni immün yanıtı uyarır, böylece tekrar yeni kaçak mutantlar oluşur. Eğer, böyle bir antikor cevabı yoksa, bu kaçak mutantların seçilmesi de söz konusu olmayacaktır. Agamaglobulinemik hastalarda sekans değişikliğinin görülmemesi bunu desteklemektedir. HIV ile koenfeksiyonu olan kronik hepatit C'li hastalarda ise sadece HCV ile enfekte olan hastalara kıyasla daha yüksek bir genomik değişkenlik söz konusudur. Bu durum, muhtemelen HIV ile enfekte hastalarda immün kapasitenin HCV'nü değişime zorlayacak kadar var olması ancak immunodominant tipi temizlemeye yetmemesi ile açıklanabilir. Böylece yeni varyantlarla birlikte daha önceki quasispecies birlikte bulunarak birikmektedir^{6,18,17}. Hipervariabilitenin derecesi yani quasispecies sayısı interferon tedavisine yanıtı etkileyebilen (viral seviye ile birlikte) önemli bir faktördür. İnterferon tedavisine yanıtı olmayan ya da geçici yanıt veren hastaların, uzun dönem yanıt veren hastalara göre daha heterojen bir viral topluluğa sahip olduğu gösterilmiştir¹⁹.

Nükleotid sekans karşılaştırmaları ile birçok HCV genotipi olduğu anlaşılmıştır^{20,15}.

Bu nükleik asit sekanslarına dayanarak yapılan filogenetik çalışmalar

HCV'nün en az 6 majör genotipi ve 80'den fazla subtipi olduğunu göstermiştir. İlk olarak ABD'de izole edilen genom prototip olarak kabul edilmiştir. Daha sonra bir çok ülkedeki non-A non-B hepatitli hastalardan başka genotipler klonlanmıştır^{10,12,21,22,11,23}. Bazı araştırmacılar tarafından 7, 8, 9, 10 ve 11. genotipler de tanımlanmıştır. Ancak daha sonra yapılan araştırmalar 7, 8, 9 ve 11. genotiplerin aslında genotip 6'nın subtipleri ve 10. genotipin de aslında genotip 3'ün subtipleri olarak sınıflanması gerektiğini göstermiştir^{24,25,26}.

HCV'nün tiplenmesi için en iyi yöntem tüm genomun sekanslanmasıdır. Ancak bu pratik değildir. Bu nedenle, genotipleme için birçok yöntem denenmiştir. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) bu metodlardan biridir. Bazı araştırmacılar, yine subtiplerin tayini için daha pratik bir yol olarak üçüncü kuşak bir enzim immunoassay metodunu (Roche Cobas Core anti-HCV EIA) önermiş ve bunun, PCR ile kıyaslanabilir olduğunu göstermişlerdir^{27,14,28}.

Yapılan birçok çalışmada genotipler arasındaki farklılığın tüm HCV genomu boyunca varolduğu gösterilmiştir. Bu nedenle genotipleme tüm genom yerine sadece bir bölge üzerinden de yapılabilir. Ancak genotiplemenin doğru yapılabilmesi için uygun bir bölgenin seçilmesi şarttır. Bu bölge, aynı genotipe ait izolatlarda aynı sekansları göstermeli bununla beraber farklı genotiplerden belirgin sekans farklılıkları içermelidir. Günümüzde 5'NCR, C, E1, E2/NS1, NS 2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b ve 3'NCR bölgelerinden hangisinin genotipleme için daha uygun olduğu konusu halen tartışılmaktadır^{28,14}.

Sadece 5' NCR bölgesi değerlendirildiğinde daha az sayıda genotip saptanabileceği gibi sadece hypervariable region değerlendirildiğinde ise her bir izolat tek bir genotipi temsil edebilir¹⁵. Bunun tersine, 5' NCR ve E1 bölgesinin sekanslanmasıyla yapılan sınıflamanın aynı değerde ve etkili bir yol olduğunu ileri süren araştırmacılar vardır²². Bu nedenle birçok araştırmacı farklı bölgeleri kullanarak genotipleme yapmıştır. Genotipleme için serolojik ELISA testleri önerenler de olmuştur²⁹.

HCV genomu üzerindeki her bir genetik elemanın uzunluğu farklı

genotiplerde değişiktir. Özellikle, E2, NS5a ve 3' NCR bölgelerinin uzunlukları farklı genotipler arasında oldukça değişkendir. NS5a bölgesi, genotip III/2a ve IV/2b'de 20 aminoasitlik ek bir sekans içerir. 3' NCR bölgesinde, korunmuş bir motif olan CACTCC, genotip III/2a ve IV/2b'de genotip I/1a, II/1b, 1c ve V/3a'dan farklı bir yerde yerleşmiştir. Buna göre HCV sekansları öncelikle iki ana gruba ayrılabilir: I/1a, II/1b, 1c ve V/3a bir grup ve III/2a ve IV/2b diğer grup¹⁴.

HCV genotipleri 4 hiyerarşik sınıf içine alınır: gruplar (ya da tipler), subgruplar (ya da subtipler), izolatlar, quasispecie'ler^{14,30}.

HCV'nü sınıflamada en güvenilir ve tam olan tek yol genomik sekanslamadır. HCV'nün klasifikasyonu da günümüzde genomik sekansların klasifikasyonundan başka bir şey değildir. NS5 bölgesi için söylenecek olursa; farklı gruplar arasındaki sekans benzerliği %56-72'dir. Aynı grup içindeki subgruplar arasında sekans benzerliği %74-86 iken izolatlar arası sekans benzerliği %88-99,5'tur. Buna göre, bilinen sekanslarda %72'den az benzerliği olan bir sekans yeni bir grubu gösterir. Genomun diğer bölgeleri için bu rakamlar kabaca aynı olmakla beraber küçük değişiklikler gösterir¹⁴. (Tablo I).

Klasifikasyon için bir çok araştırmacı değişik şemalar önermiştir: (Enomoto et al. 1990, Houghthon et al. 1991, Okamoto et al. 1992, Cha et al. 1992, Simmonds et al. 1993a). (Tablo II)

Tablo I. Farklı bölgelere göre gruplar, subgruplar ve izolatlar arası sekans benzerlik oranları.

	<u>E 1</u>	<u>NS 4</u>	<u>NS 5</u>
<u>İZOLAT</u>	% 88-99	% 87-97	% 88-99.5
<u>SUBGRUP (SUBTİP)</u>	% 67-78	% 74-81	% 74-86
<u>GRUP (GENOTİP)</u>	% 53-69	% 54-69	% 56-72

Farklı genotipler arasında hastalık şiddeti, tedaviye cevap oranı, virüs-konak ilişkisi ve muhtemel aşı geliştirilmesi imkanı açısından farklar vardır.

Bütün raporlarda genotip II/1b ile III/2a farklı uçlarda yer alır. Yapılan çalışmalarda klinik özellikler arasında belirgin farklılık bulunamamakla beraber genotip 1b'li hastalarda ilerlemiş karaciğer hastalığı daha sık görülmektedir^{31, 14,8,33}.

Tablo II.HCV genotipleri için önerilmiş olan çeşitli sınıflama sistemleri.

Yayınlanmış Örnekler	Simmonds	Okamoto	Enomoto	Cha
HCV-1	1a	I	K-PT	G I
HCV-J, -BK	1b	II	K-1	G II
EG-28	1c.	Nc	Nc	Nc
HC-J6	2a	III	K-2a	G III
HC-J8	2b	III	K-2b	G III
TO 994	2c.	III	Nc	G III
E-B1, Ta	3a	IV	Nc	G IV
Tb	3b	IV	Nc	G IV
EG-16, 29, 33	4a	Nc	Nc	Nc
SA-1, 7, 11	5a	V	Nc	G V
HK-1, 2, 3, 4	6a	Nc	Nc	Nc

(Nc: Sınıflandırılmamış.)

Yine, genotip 1b ile enfekte hastalarda hepatoselüler karsinoma gelişme sıklığı da diğer genotiplerle enfekte olan hastalara göre daha yüksektir³⁴.

Bu farka neden olan özellikler kesin olarak bilinmemekle beraber, iki genotip arasındaki farklar şunlardır:

1) Genom uzunluğu genotip II/1b için 9412 nt iken genotip III/2a için 9481 nt'dir.

2) Genotip II/1b E2/NS1 bölgesinde iki hypervariable bölge (HRV-1 ve HRV-2) içerirken genotip III/2a sadece bir hypervariable bölge içerir.

Bu yüzden genotip II/1b, konağın immün baskısından kaçmak için genotip III/2a'ya göre çok daha uygun bir genomik yapıya sahiptir. Bu iki karakter ile genotip II/1b'nin ilerlemiş karaciğer hastalıklarında ve interferona dirençli hastalarda neden daha sık rastlandığı açıklanabilir¹⁴.

Genotip 1b, 2a, 2c ve 4, genotip 1a ve 3a'ya göre daha yüksek serum HCV RNA konsantrasyonlarına sahiptir^{31,35}.

Yapılan birçok araştırmada, genotip 1b'li hastaların ortalama enfeksiyon süreleri daha uzun bulunmuştur. Bu durum, yüksek serum HCV RNA düzeylerini açıklayabilir. Ayrıca hem enfeksiyonun süresinin hem de serum HCV RNA seviyelerinin karaciğerdeki histopatolojik lezyonların ciddiyetini ve interferon tedavisine yanıtı etkileyeceği göz önüne alınmalıdır³⁶.

Genotip ile ALT, serum albumin, GGT gibi biyokimyasal parametreler arasında anlamlı ilişki yoktur. Yine, total histolojik aktivite indeksi (HAI) ve HAI subgrupları (periportal±bridging hepatoselüler nekroz; intralobular dejenerasyon ve fokal hepatoselüler nekroz; portal inflamasyon; fibrozis) ile genotip arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır³⁵.

HCV RNA'yı kantitatif olarak ölçebilmek için birçok farklı yöntem geliştirilmiştir³⁷.

Serum HCV RNA konsantrasyonu ile ALT, AST, GGT, albumin, gama globulin gibi biyokimyasal parametreler arasında ilişki bulunamamıştır^{38,35}.

Bununla beraber, bir çok araştırmacı ilerlemiş karaciğer hastalığı olan hastalarda viremi düzeyini daha yüksek olarak saptamış ve HCV RNA düzeyini hastalığın şiddetini ve tedaviye yanıtı belirlemede bağımsız bir risk faktörü olarak belirlemiştir. HCV RNA titresi, normal ALT seviyelerine sahip olan sağlıklı kan vericilerinde en düşük düzeylerde saptanırken, yüksek ALT seviyelerine sahip kan vericilerinde ve klinik olarak aşikar kronik aktif hepatiti olan hastalarda daha yüksek düzeylerde ve siroz ya da son dönem karaciğer hastalığı olan hastalarda en yüksek düzeylerde saptanmıştır³⁹.

Tedavi öncesi HCV RNA titresi düşük bulunan hastalarda tedaviye uzun dönem yanıt oranı, HCV RNA titresi yüksek olanlara göre daha fazla olarak saptanmıştır. Bunu destekler şekilde, interferon tedavisiyle hem kısa dönem hem de uzun dönem yanıt alınan hastalarda viremi düzeylerinde düşüş saptanmıştır^{31,19}.

Kronik persistan hepatiti olan hastalarda, kronik aktif hepatiti veya sirozu

olan hastalara göre oldukça düşük HCV-RNA düzeyleri bulunmuştur. Bazı araştırmacılar enfeksiyonun süresinin uzamasıyla viremi düzeyinin arttığını bildirirken (Kato et al., Toyoda et al.) bazıları da azaldığını (Margin et al.) iddia etmektedir. HCV'nün esas olarak hepatositlerde replike olduğu ve yarı-ömrünün 2 gün gibi kısa bir süre olduğu düşünülürse, mantıklı olarak son dönem siroz hastalarında düşük viremi düzeyleri beklenir. Bununla beraber, bir çok araştırmacı da serum HCV RNA düzeylerini farklı histolojik tanıları olan hastalarda farklı düzeylerde bulmuş ancak istatistiksel anlam saptayamamıştır^{38,35}.

HCV düşük bir hızla replike olduğu için, saptanması ve intrahepatik lokalizasyonunun gösterilmesi teknik olarak zordur. HCV RNA in situ reverse-transcription polymerase chain reaction (IS-RT-PCR) yöntemi kullanılarak formalin ile fikse edilmiş parafin blokları karaciğer örneklerinde saptanabilmiştir. HCV RNA karaciğer hücrelerinin sitoplazmalarında %0-35 (ortalama %5) oranında ve çok nadir olarak da mononükleer hücrelerde gösterilebilir. Karaciğer hücrelerinde HCV RNA'nın ekspresyonu ile klinik, biyokimyasal parametreler ve histolojik aktivite indeksinin aktivite skorları arasında hiçbir korelasyon yoktur^{40,41,42}. Ancak, karaciğer HCV RNA miktarı ile HCV tarafından enfekte edilmiş hepatositlerin sayısı arasında belirgin korelasyon vardır. Karaciğerde HCV RNA'nın IS-RT-PCR ile saptanması yüksek serum HCV RNA seviyeleri ile ilişkilidir. İnterferon tedavisi ile HCV RNA'nın karaciğer tarafından ekspresyonu azalmakta ancak belirgin olarak değişmemektedir^{43,41}.

En yüksek karaciğer HCV RNA seviyeleri ve HCV ile enfekte hepatosit sayıları genotip 1b ile enfekte hastalarda saptanmıştır. İnterferon tedavisine yanıt vermeyen hastalarda bu iki parametre belirgin olarak yüksek bulunmuştur^{44,41}.

HCV ile enfekte hastaların karaciğer materyallerinde, nükleokapsid proteinine karşı monoklonal antikolar ve HCV'nün yapısal ve yapısal olmayan antijenlerine karşı poliklonal IgG tabiatında antikolar kullanılarak yapılan immunoperoksidaz boyaması ile hepatosit ve mononükleer hücrelere ek

olarak, safra kanalı, sinüzoidal, lenfoid ve hepatoma hücrelerinde de çeşitli yapısal ve yapısal olmayan proteinler gösterilmiştir⁴⁵.

Farklı coğrafik lokalizasyonlarda değişik genotipler görülür. Birçok ülkede araştırmacılar çeşitli tarama çalışmaları ile populasyonda hakim olarak görülen genotipleri belirlemişlerdir. En sık görülen genotip ABD ve Batı Avrupa'da 1a ve 1b iken Japonya ve Tayvan'da 1b, 2a ve 2b, Tayland, Kuzey Avrupa ve Avustralya'da 3, Orta Doğu'da 4, Güney Afrika'da 5 ve Hong Kong'ta tip 6'dır^{20,15,46,53,12,47,14,16,23,48}. (Tablo III).

Tablo III. HCV genotiplerinin coğrafi dağılımı.

Genotip	Coğrafi predominans
1a	USA ve gelişmiş batı ülkeleri
1b	USA, Japonya, Avrupa
2	Japonya, Tayvan
3	Kuzey Avrupa, Avustralya (IV ilaç kullananlarda sık)
4	Orta Doğu ve Kuzey Afrika
5	Güney Afrika
6	Asya

Tüm dünyada HCV ile HCC arasında güçlü bir ilişki dökümente edilmiştir. Türkiye'de, hepatoselüler karsinomali hastalardaki anti-HCV prevalansı Uzak Doğu ve Afrika'dan bildirilen rakamlarla hemen hemen aynıdır (% 6,3). Bu durum, Türkiye'de HBsAg pozitifliği oranının yüksek (%4,5-13,9) ve anti-HCV pozitifliği oranının düşük (% 0,7) olması ile açıklanabilir⁴⁹.

Farklı HCV genotiplerinin HCC gelişimi üzerindeki etkileri henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Genotip 1b ve 4, HCC gelişimi için daha yüksek risk gösteriyor olmakla beraber hangi genotipin daha çok HCC gelişimine neden olduğu net olarak saptanamamıştır^{34,50}.

HCV'nün selüler hasar, replikasyon ve persistansının mekanizmaları iyi bilinmemektedir. Moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılabilmiş olmakla beraber HCV enfeksiyonunda konağın immün yanıtı yetersiz kalmaktadır ve enfeksiyonun gelişmesinde hem humoral hem de hücrel immün yanıtlar

önemli gibi gözükmetedir⁵¹.

HCV enfeksiyonunda nötralizan antikorlar gelişir, ancak bunlar izolatlara spesifiktirler ve koruyucu değildir. Core, NS3 ve NS5 bölgelerine karşı gelişmiş olan antikorların şempanzeleri reenfeksiyondan korumadığı gösterilmiştir. Bu durum, insanların ve şempanzelerin neden aynı ya da farklı HCV türü ile reenfekte olabildiğini ve kronik HCV enfeksiyonunun yüksek oranını açıklayabilir⁶. Viremili hastalarda viral genotipin mononükleer hücrelerin interferon ya da endotoksine cevabı üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı ileri sürülmektedir. Öyle görünmektedir ki, kanda HCV'nün varlığı genotipten bağımsız olarak, interferon sisteminin aktivasyonundaki bir defekt ile ilişkilidir⁵².

Verilen anti-viral tedaviye alınması beklenen cevabın muhtemel belirteçleri: hafif ya da orta dereceli karaciğer inflamasyonu, düşük vücut ağırlığı, sirozun olmaması, enfeksiyonun kısa süreli olması, düşük karaciğer demir içeriği, düşük serum ve hepatik HCV RNA seviyeleri ve tip 1b haricinde bir genotip olmasıdır³³. (Tablo IV).

IFN tedavisiyle virüs eradikasyonunu etkileyen en önemli faktör viral yüküdür. HCV RNA<10000 kopya/ml olan hastaların %75'inde tedavi başarılı olurken; HCV RNA>1000000 kopya/ml olanlarda başarı %11-20 olmuştur. HCV RNA 10000-100000 olan hastalarda cevap oran yüksek doz IFN ile %38 iken düşük doz gurubunda %25 bulunmuştur (p=0,029). 100000-1000000 kopya/ml olan hastalarda yine yüksek doz IFN daha etkili olmakla beraber istatistiksel anlam saptanamamıştır. 5000000 kopya/ml 'den fazla viral yükü olan hastalarda her iki doz rejimiyle de cevap %5'in altında kalmıştır.

Tablo IV. Kronik hepatit C'de IFN-alfa tedavisine cevabı etkileyen faktörler.

Cevabı arttıran	Cevabı azaltan
Daha hafif karaciğer hasarı	Sirotik karaciğer
Düşük viremi (HCV-RNA<1000000 c/ml)	Yüksek viremi
HCV genotip II, III, IV	HCV genotip 1b

Kısa hastalık süresi	Uzun hastalık süresi
Genç yaş	İleri yaş (>40)
Kadın cinsiyet	Erkek cinsiyet
Normal serum GGT düzeyi	Obesite
	Artmış demir yükü (Ferritin>250 ng/ml)

IFN tedavisi ile viral eradikasyonu etkileyen bir diğer faktör HCV genotipidir. Yüksek dozda daha fazla olmak üzere her iki doz grubunda cevap oranları genotip-2'de daha yüksek bulunmuştur. Serum HCV RNA konsantrasyonu, HCV subtipi ve HCV quasispecies sayısı ile komplet cevap arasında belirgin olarak anlamlı ilişki vardır. Multivariate analizler, HCV quasispecies sayısının alfa interferon uygulaması sırasında HCV RNA'nın kaybolması için bağımsız bir belirteç olduğunu, ancak tedavi tamamlandıktan sonraki relaps ile bir ilişkisinin olmadığını göstermiştir. HCV RNA'nın uzun dönem negatifleşmesi ile ilişkili olan tek faktör tedavi öncesi HCV RNA konsantrasyonu olarak saptanmıştır³⁶.

Sonuç: HCV, tek doğal konağı insan olan pozitif sarmallı bir RNA virüsüdür. HCV flavivirüslerle pestivirüslerin ortasındadır ve flaviviridae ailesinin yeni bir üyesi olarak sınıflandırılmaktadır. HCV'nün genomunda bir heterojenite vardır ve söz konusu olan bu heterojenitenin derecesi genomun her bir bölgesi için değişiktir. Hipervariabilitenin derecesi yani quasispecies sayısı interferon tedavisine yanıtı etkileyebilen (viral seviye ile birlikte) önemli bir faktördür.

Nükleotid sekans karşılaştırmaları ile birçok HCV genotipi olduğu anlaşılmıştır. HCV genomu üzerindeki her bir genetik elemanın uzunluğu farklı genotiplerde değişiktir. HCV genotipleri 4 hiyerarşik sınıf içine alınır: gruplar (ya da tipler), subgruplar (ya da subtipler), izolatlar, quasispecies'ler³⁰. Farklı coğrafik lokalizasyonlarda değişik genotipler görülür. Birçok ülkede araştırmacılar çeşitli tarama çalışmaları ile popülasyonda hakim olarak görülen genotipleri belirlemişlerdir. En sık görülen genotip ABD ve Batı Avrupa'da 1a ve 1b iken Japonya ve Tayvan'da 1b, 2a ve 2b, Tayland, Kuzey Avrupa ve Avustralya'da 3, Orta Doğu'da 4, Güney Afrika'da 5 ve Hong

Kong'ta tip 6'dır^{20,46,53,12,47,23,48.}

Farklı genotipler arasında hastalık şiddeti, tedaviye cevap oranı, virüs-konak ilişkisi ve muhtemel aşı geliştirilmesi imkanı açısından farklar vardır. Bütün raporlarda genotip II/1b ile III/2a farklı uçlarda yer alır. Yapılan çalışmalarda klinik özellikler arasında belirgin farklılık bulunamamakla beraber genotip 1b'li hastalarda ilerlemiş karaciğer hastalığı daha sık görülmektedir. Yine, genotip 1b ile enfekte hastalarda hepatoselüler karsinoma gelişme sıklığı da diğer genotiplerle enfekte olan hastalara göre daha yüksektir. Genotip 1b, 2a, 2c ve 4, genotip 1a ve 3a'ya göre daha yüksek serum HCV RNA konsantrasyonlarına sahiptir.

Literatür bilgilerine göre genotip ile ALT, serum albumin, GGT gibi biyokimyasal parametreler arasında anlamlı ilişki yoktur. Yine, total histolojik aktivite indeksi (HAI) ve HAI subgrupları ile genotip arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Farklı yaş gruplarında farklı genotipler bulunabilmektedir. Yapılan bir çalışmada genotip 3 daha çok genç hastalarda saptanmıştır.

Sonuç olarak, HCV enfeksiyonunda genotip tayini yapılması hem virüsün oldukça karmaşık olan doğasının anlaşılabilir olarak aşı geliştirilebilmesi hem de verilecek anti-viral tedavinin gerek planlanması gerekse sonuçlarının doğru değerlendirilebilmesi için gereklidir.

Kaynaklar

1. Prince AM, Brotman B, Grady GF, et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virüs. *Lancet* 1974; 2: 241.
2. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359.
3. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virüs infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991; 325: 1325.
4. Tremolada A, Casarin C, Tagger A, et al. Antibody to hepatitis C virüs in post-transfusion hepatitis. *Ann Intern Med* 1991; 114: 277.

5. Crespo J, Lozano JL, de la Cruz F, et al. Prevalence and significance of hepatitis C viremia in chronic active hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1147.
6. Jan van Doorn L, Quint W, Tsiquaye K, et al. Longitudinal analysis of hepatitis C virüs infection and genetic drift of the hypervariable region. *J Infect Dis* 1994; 169: 1226.
7. Wong D. T. Have you seen the hepatitis C virüs? *Hepatology* 1996; 24: 465.
8. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, et al. Hepatitis C virüs: Dedection of intracellular virüs particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996; 23: 205.
9. Shimotohno K, Tanji Y, Hirowatari Y, et al. Processing of the hepatitis C virüs precursor protein. *J Hepatol* 1995; 22: 87.
10. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, et al. Molecular cloning of the human hepatitis C virüs genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9524.
11. Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, et al. Structure and organization of the hepatitis C virüs genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991; 65: 1105-1113.
12. Li JS, Vivitski L, Tong SP, et al. Characterization of the third most common genotype of hepatitis C virüs in France *J Hepatol* 1995; 22(Suppl. 1): 74.
13. Choo QL, Richman KH, Han JH, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virüs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2451.
14. Okamoto H, Mishiro S. Genetic heterogeneity of hepatitis C virüs. *Intervirolgy* 1994; 37: 68.
15. Cha TA, Beall E, Irvine B, et al. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 88: 7144.
16. Qu D, Hantz O, Gouy M, et al. Heterogeneity of hepatitis C virüs genotypes in France. *J Gen Virol* 1994; 75: 1063.
17. Sherman KE, Andreatta C, O'Brien J, et al. Hepatitis C in human immunodeficiency virüs-coinfected patients: Increased variability in the hypervariable envelope coding domain. *Hepatology* 1996; 23: 688.
18. Lawal Z, Petrik J, Wong WS, et al. Hepatitis C virüs genetic variability in untreated and immunosuppressed patients. *Virology* 1997; 228: 107.
19. Shindo M, Hamada K, Koya S, et al. The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology* 1996; 24: 1018.

20. Bukh J, Purcell RH and Miller RH. At least 12 genotypes of hepatitis C virüs predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8234.
21. Shrestha SM, Tsuda F, Okamoto H, et al. Hepatitis B virüs subtypes and hepatitis C virüs genotypes in patients with chronic liver disease in Nepal. *Hepatology* 1994; 19: 805.
22. Simmonds P, Smith DB, McOmish F, et al. Identification of genotypes of hepatitis C virüs by sequence comparisons in the core, E1 ve NS5 regions. *J Gen Virol* 1994; 75: 1053.
23. Tokita H, Shrestha SM, Okamoto H, et al. Hepatitis C variants from Nepal with novel genotypes and their classification into the third major group. *J Gen Virol* 1994; 75: 931.
24. Mizokami M, Gojobori T, Ohba K, et al. Hepatitis C virüs types 7, 8, and 9 should be classified as type 6 subtypes. *J Hepatol* 1996; 24: 622.
25. Tokita H, Okamoto H, Iizuka H, et al. Hepatitis C virüs variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. *J Gen Virol* 1996; 77: 293.
26. Tokita H, Okamoto H, Tsuda F, et al. Hepatitis C virüs variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth and ninth major genetic groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1102.
27. Huber KR, Sebesta C and Bauer K. Detection of common hepatitis C virüs subtypes with a third-generation enzyme immunoassay. *Hepatology* 1996; 24: 471.
28. Nakao T, Enomoto N, Takada N and Date T. Typing of hepatitis C virüs genomes by restriction fragment length polymorphism. *J Gen Virol* 1991; 72: 2105.
29. Tanaka T, Kohara KT, Yamaguchi K, et al. Significance of specific antibody assay for genotyping of hepatitis C virüs. *Hepatology* 1994; 19: 1347.
30. Simmonds P. Variability of hepatitis C virüs. *Hepatology* 1995; 21: 570.
31. Kobayashi M, Tanaka E, Sodeyama T, et al. The natural course of chronic hepatitis C: A comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology* 1996; 23: 695.
32. Samaniego JG, Soriano V, Bravo R, et al. Influence of hepatitis C virüs genotypes and HIV infection on histological severity of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1130.
33. Shiratori Y, Kato N, Yokosuka O, et al. Predictors of the efficacy of interferon therapy in chronic hepatitis C virüs infection. *Gastroenterology* 1997; 113: 558.

34. Akkiz H, Colakoğlu S, Köksal F, et al. Hepatitis C virüs genotypes in patients with hepatocellular carcinoma. *J Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 1996; 15: 85.
35. Zeuzem S, Franke A, Lee JH, et al. Phylogenetic analysis of hepatitis C virüs isolates and their correlation to viremia, liver function tests, and histology. *Hepatology* 1996; 24: 1003.
36. Toyoda H, Kumada T, Nakano S, et al. Quasispecies nature of hepatitis C virüs and response to alpha interferon: significance as a predictor of direct response to interferon. *J Hepatol* 1997; 26: 6.
37. Navas S and Carreno V. Semiquantification by Amplicor™ assay of hepatitis C virüs genome during therapy. *J Hepatol* 1995; 22(suppl. 1): 115.
38. Kao JH, Lai MY, Chen PJ, et al. Clinical significance of serum hepatitis C virüs titers in patients with chronic type C hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 506.
39. Gretch D, Corey L, Wilson J, et al. Assesment of hepatitis C virüs RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: High- titer viremia correlates with advanced stage of disease. *J Infect Dis* 1994; 169: 1219.
40. McCormick SE, Goodman ZD, Maydonovitch CL and Sjögren MH. Evaluation of liver histology, ALT elevation, and HCV RNA titer in patients with chronic hepatitis C *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1516-.
41. McGuinness PH, Bishop GA, Painter DM, et al. Intrahepatic hepatitis C RNA levels do not correlate with degree of liver injury in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23: 676.
42. Napoli C, Bishop AG, McGuinness PH, et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology* 1996; 24: 759.
43. Lau GKK, Davis GL, Wu SPC, et al. Hepatic expression of hepatitis C virüs RNA in chronic hepatitis C: A study by in situ reverse-transcription polymerase chain reaction. *Hepatology* 1996; 23: 1318.
44. Ballardini G, Manzin A, Giostra F, et al. Quantitative liver parameters of HCV infection: relation to HCV genotypes, viremia and response to interferon treatment. *J Hepatol* 1997; 26: 779.
45. Nouri-Aria KT, Sallie R, Mizokami M, et al. The value of identifying hepatitis C virüs in liver pathology specimens. *J Pathol* 1995; 175: 77.

46. Guadagnino V, Stroffolini T, Rapicetta M, et al. Prevalence, risk factors and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: A community-based survey in Southern Italy. *Hepatology* 1997; 26: 1006.
47. Murphy DG, Willems B, Vincelette J, et al. Biological and clinicopathological features associated with hepatitis C virus type 5 infections. *J Hepatol* 1996; 24: 109.
48. Valliammai T, Thyagarajan SP, Zuckerman AJ and Harrison TJ. Diversity of genotypes of hepatitis C virus in Southern India. *J Gen Virol* 1995; 76: 711.
49. Özyilkan Ö, Arslan M and Özyilkan E. Hepatitis B virus and hepatitis C virus infections in Turkish patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1479.
50. Naoumov NV, Chokshi S, Metivier E, et al. Hepatitis C virus infection in the development of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 27: 331.
51. Araya V, Rakela J, and Wright T. Hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology*. 1997; 112: 575.
52. Podevin P, Guechot J, Serfaty L, et al. Evidence for a deficiency of interferon response in mononuclear cells from hepatitis C viremic patients. *J Hepatol* 1997; 27: 265.
53. Holland PV, Barrera JM, Ercilla MG, et al. Genotyping hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China, and Macau by a simplified PCR method. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2372.

Yazışma Adresi:

Dr. Fatih Yüksel IŞIKŞAL
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Gastroenteroloji Bilim Dalı
Balcalı/ADANA
Tel: 0322 338 60 60 (3167)
Fax: 0322 338 66 30
e-posta: isiksalfatih@hotmail.com