

Kronik Hepatit C Enfeksiyonu Olan Hastalarda Paraoksonaz-1 Gen Polimorfizmi ile Tedaviye Yanıt Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Investigation of the Association Between Paraoxonase-1 Gene Polymorphisms and Response to Therapy in Chronic Hepatitis C Patients

Kazım KIRATLI¹, Hanefi Cem GÜL¹, Cumhuri ARTUK¹, Salih KOZAN², Ali ÖZTUNA², Yusuf TUNCA², Can Polat EYİGÜN¹

¹ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Gulhane Military Medical Academy, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Ankara.

² Gulhane Military Medical Academy, Department of Medical Genetics, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 16.06.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.09.2014

ÖZET

Karaciğer tarafından üretilen ve dolaşımda yüksek yoğunluklu lipoproteinlere bağlı olarak bulunan paraoksonaz-1 (PON1) enzimi, okside lipid miktarını azaltan antioksidan özelliğe sahiptir. İnsanda 7. kromozom üzerinde birbirine komşu üç farklı PON gen bölgesi bulunur. PON1 geni ve polimorfizmleri ile çeşitli hastalıklar arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Hepatit C virusunun (HCV) ise, hücredeki replikasyon döngüsünün tüm safhalarında lipoproteinlerle olan yakın ilişkisi ve konağın lipid metabolizmasını değiştirdiği bilinmektedir. Bu çalışmada, birçok kronik hastalığın fizyopatolojisinde rol aldığı düşünülen PON1 enziminin 55. ve 192. bölgelerindeki aminoasit değişikliklerinin, kronik hepatit C virus (HCV) enfeksiyonunda tedavi yanıtındaki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, anti-HCV ve HCV-RNA pozitif, tümü HCV genotip 1b ile enfekte 49 kronik hepatit C'li hasta (27 erkek, 22 kadın; yaş ortalaması 52.9 ± 12.6 yıl) dahil edilmiştir. En az bir kez pegile interferon + ribavirin tedavisi almış ve tedavi sonrası 6. ayda HCV-RNA'sı negatif olan hastalar yanıtı, pozitif olanlar ise yanıtı olarak kabul edilmiştir. Hastaların rutin takipleri esnasında alınan tam kan örneklerinden genomik DNA'lar elde edilmiş ve T-ARMS-PCR (Tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction) yöntemiyle PON1 enziminin 55. ve 192. bölgelerindeki L/M55 ve Q/R192 polimorfizm analizleri yapılmıştır. Çalışmamızda, tedaviye yanıtı hastalarda, 55. pozisyonunda saptanan genotipler; LL: %44.1, LM: %44.1, MM: %11.8; 192. pozisyonunda ise QQ: %55.9, QR: %41.2 ve RR: %2.9 olarak belirlenmiştir. Olguların kombine genotip analizleri incelendiğinde, tek bir olgunun LL/RR genotipine sahip olduğu ve

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Hanefi Cem Gül, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06010, Etlik, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 304 4309, **E-posta (E-mail):** hcgul@yahoo.com

bu olgunun tedaviye yanıtı olduğu izlenmiştir. Olguların sekizinde ise LL/QQ genotipi tespit edilmiş ve bunlardan yedisinin (%87.5) tedaviye yanıtı olduğu belirlenmiştir. Ancak yapılan istatistiksel analizlerde, PON1 L/M55 ve PON Q/R192 polimorfizmleri ile kronik hepatit C (KHC) tedavisine yanıt arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (Ki-kare testi, $p > 0.05$). PON1 polimorfizmleri ile KHC arasındaki ilişkiyi işaret eden az sayıdaki çalışmanın aksine, bizim çalışmamızda bu ilişkinin belirlenememiş olması, hasta sayısının görece olarak az olmasına bağlı olabilir. Sonuç olarak, HCV enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan ilaçların kısıtlı ve yüksek maliyetli olması nedeniyle, KHC ve PON1 polimorfizmleri arasındaki bağlantının daha geniş hasta gruplarında yapılacak çalışmalarla devam etmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Kronik hepatit C; tedavi; paraoksonaz-1; polimorfizm.

ABSTRACT

Liver-derived paraoxonase-1 (PON1) enzyme that is found in the circulation is bound to high-density lipoproteins and reduces the amount of oxidized lipids with its antioxidant effect. Humans have at least three different PON gene regions which are adjacent to the other on the 7th chromosome. It has been shown that PON1 gene and its polymorphisms are related with various diseases. It is also known that, hepatitis C virus (HCV) is tightly associated with the cell lipoproteins in each step of its replication cycle leading to modulation of the host lipid metabolism. The aim of this study was to investigate the relationship between the response to chronic hepatitis C (CHC) therapy and aminoacid changes in 55' and 192' regions of PON1 enzyme believed to be involved in the pathophysiology of many chronic diseases. A total of 49 CHC patients (27 male, 22 female; mean age: 52.9 ± 12.6 yrs), all infected with HCV genotype 1b and positive for anti-HCV and HCV-RNA were included in the study. Patients who were HCV-RNA negative at the sixth month following at least once pegylated interferon + ribavirin treatment, were considered as therapy-responders, whereas those who were HCV-RNA positive were considered as non-responders. The genomic DNAs were isolated from patients' blood samples in their routine follow-ups and Q/R192 and L/M55 PON1 polymorphism analysis in 55. and 192. regions was performed by T-ARMS-PCR (Tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction) method. In our study, the analysis of PON1 polymorphisms yielded 44.1% of LL, 44.1% of LM and 11.8% of MM genotypes at position 55 and 55.9% of QQ, 41.2% of QR, and 2.9% of RR genotypes at position 192 in therapy-responders. In the evaluation of combined genotype analysis of the patients, there was only one case who was responsive to treatment with LL/RR genotype. Of the patients, eight harbored LL/QQ genotypes and seven of them (87.5%) were responsive to treatment. However, statistical analysis indicated that there was no relationship between PON1 L/M55 and PON Q/R192 polymorphisms and response to CHC treatment (chi-square test, $p > 0.05$). Our data did not support a relationship between PON1 polymorphisms and response to CHC therapy, in contrast to a few studies pointing out of this correlation. This might be attributed to relatively low number of patients included. In conclusion, since antiviral agents used for CHC therapy are limited and costly, it was thought that further investigations with large numbers of patients should be conducted to establish the presence of any relationship between the response to CHC therapy and genotypes of the PON1 enzyme.

Key words: Chronic hepatitis C; therapy; paraoxonase-1; polymorphism.

GİRİŞ

İnsan serum paraoksanaz (PON) enzimi; sistematik adı ile aril-dialkil-fosfotaz, yüksek yoğunluklu lipoproteinlerle birlikte bulunan, düşük yoğunluklu lipoproteinleri serbest radikallerin indüklediği oksidasyona karşı koruma özelliği de olan ve 43-45 kilodalton molekül ağırlıklı bir ester hidrolazdır¹. Enzim, karaciğerde sentezlenmekte olup aktivitesi

ve stabilitesi için kalsiyum gerekmektedir. İnsanda 7. kromozomun uzun kolunda, q21.3 ile q22.1 bölgesinde lokalize olan birbirine komşu üç farklı PON geni (PON1, 2, 3) mevcuttur². PON1 geni, substratlarının belirlenmesi ve ateroskleroz ile birlikteliğinin ortaya konması nedeniyle, PON2 ve PON3'e göre daha iyi aydınlatılmış olan gendir^{3,4}. PON1 geni, glutamin (Q)/arjinin (R) 192 ve lösin (L)/metiyonin (M) 55 olmak üzere iki önemli polimorfizm göstermektedir. Yaygın olan Q/R192 polimorfizmi substrata bağımlıdır ve farklı ırklara göre değişkenlik gösterdiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır^{4,5}. PON1 enzimi 354 aminoasit içeren glikoprotein yapısında bir enzimdir. Lipid metabolizması ile olan ilişkisi, antioksidan özellikleri ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu rolü olduğunun düşünülmesi nedeniyle, PON1 enzimi ve polimorfizmleri ile birçok hastalık (koroner arter hastalığı, tip II diabetes mellitus, iskemik inme, kronik hepatit, ateroskleroz, migren, Alzheimer gibi) arasında ilişki olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur⁶⁻⁸.

Hepatit C virusu (HCV) enfeksiyonu, ciddi bir global sağlık sorunu olup, tüm dünyada yaklaşık 200 milyon kişi HCV ile enfekte⁹. Zarflı, ikozahedral yapılı, tek iplikli pozitif polariteli bir RNA virusu olan HCV, konak hücreye lipid reseptörlerine bağlanarak girmekte ve replikasyonunu artırmak için hücrenin lipid metabolizmasını değiştirmektedir¹⁰. HCV enfeksiyonu sırasında lipogenezde artış, lipid sekresyonu ve oksidasyonunda azalma görülmektedir¹⁰.

Kronik hepatit C (KHC) tedavisine yanıtta; virusa, konağa ve kullanılan ilaçlara bağlı çok çeşitli faktörler belirleyici rol oynamaktadır¹¹. Örneğin son yıllarda tanımlanan IL-28B gen polimorfizminin, tedavi yanıtı üzerindeki etkisine dair önemli veriler mevcuttur¹²⁻¹⁵. Buna karşın PON1 polimorfizmi ile KHC arasındaki ilişkinin araştırıldığı yayın sayısı oldukça kısıtlıdır^{16,17}. Bu çalışmada, birçok kronik hastalığın fizyopatolojisinde rol aldığı düşünülen PON1 enziminin 55. ve 192. bölgelerindeki aminoasit değişikliklerinin, kronik HCV enfeksiyonunda tedavi yanıtı üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, tümü HCV genotip 1b ile enfekte, anti-HCV ve HCV-RNA pozitif KHC'li hastalar, bilgilendirilmiş onamları alındıktan sonra dahil edildi. En az bir kez pegile interferon + ribavirin (Peg-IFN + RBV) tedavisi almış ve tedavi sonrası 6. ayda HCV-RNA'sı negatif olan hastalar yanıtlı, pozitif olanlar ise yanıtız olarak kabul edildi. Rutin takipleri esnasında alınan tam kan örneklerinden genomik DNA'lar elde edildi ve polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR) kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Daha sonra Hashemi ve arkadaşlarının^{18,19} çalışmalarında kullandıkları T-ARMS-PCR (Tetra-Primer Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction) yöntemiyle PON1 L/M55 ve Q/R192 polimorfizm analizleri yapıldı. Primer setleri aynen kullanılırken, PCR koşullarında ve ana karışım (master mix) bileşeni oranlarında bazı küçük modifikasyonlar yapıldı (Tablo I). Çalışma, hastanemiz etik kurulundan alınan onay (15 Şubat 2013 tarih ve EĞT. ÖÇT.:1491-140-13/1648.4-425 sayılı karar) ile gerçekleştirildi.

PON1 L/M55 Polimorfizm Analizi

Bu amaçla PCR programı kullanılarak tek bir reaksiyon yapıldı. Reaksiyon toplam 20 µl hacminde gerçekleştirildi. Yapılan PCR ile L aleli için 351 baz çifti (bç), M aleli için ise

Tablo I. PON1 L/M55 ve Q/R192 Polimorfizm Analizinde Kullanılan Primerler

	PON1 L/M55 için	PON1 Q/R192 için
Dış Fw	5'-GGC TTT TGT ACG TTT TGT G-3'	5'-TGT TCC ATT ATA GCT AGC ACG A-3'
Dış Rv	5'-CCG AAG AAC ACA AAT ATG CA-3'	5'-TTT CAC CCC CTG AAA AAT TA-3'
İç Fw	5'-CAG AAA CTG GCT CTG AAG TCA-3'	5'-TTT CTT GAC CCC TAC TTC CA-3'
İç Rv	5'-TCC ATT AGG CAG TAT CTC GAA-3'	5'-CAA ATA CAT CTC CCA GGC TC-3'
Fw: Forward; Rv: Reverse.		

262 bp büyüklüğünde ürün elde edildi. Aynı zamanda 571 bp uzunluğundaki kontrol bandı da elde edildi. Elde edilen PCR ürünleri, %2'lik agaroz jel elektroforezinde 100 volt sabit akımda yürütüldü. Görüntüleme yöntemi olarak etidyum bromür (EtBr) boyama; görüntüleme işlemi için UV transilüminator kullanıldı.

PON1 Q/R192 Polimorfizm Analizi

Bu amaçla PCR programı kullanılarak tek bir reaksiyon yapıldı. Reaksiyon toplam 25 µl hacminde gerçekleştirildi. Yapılan PCR ile Q aleli için 303 bp, R aleli için ise 233 bp büyüklüğünde ürün elde edildi. Aynı zamanda 496 bp uzunluğundaki kontrol bandı da elde edildi. Elde edilen PCR ürünleri, %2'lik agaroz jel elektroforezinde 100 volt sabit akımda yürütüldü. Görüntüleme yöntemi olarak EtBr boyama; görüntüleme işlemi için UV transilüminatör kullanıldı.

Veriler bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra SPSS 15.0 istatistik paket programı ile analizleri yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak frekans, ortalama, standart sapma ve yüzdelik değerler kullanıldı. Hastaların tedaviye yanıt durumları ile PON1-55 ve -192 gen polimorfizmleri arasındaki istatistiksel farklılıklar Ki-kare testi ile belirlendi; $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

KHC tanısı ile tedavi edilen ve tümü genotip 1b ile enfekte olan 49 hastanın yaş ortalaması 52.9 ± 12.6 yıl olup, 27 (%55.1)'si erkek, 22 (%44.9)'si kadındır. Çalışma grubunun 34 (%69.4)'ü tedaviye yanıtı, 15 (%30.6)'i tedaviye yanıtı olmayan hastalardan oluşmaktadır. Bu sonuçla tedavi başarısı, dünya ortalamasının üzerinde kabul edilebilir. Bu durumun, hastaların çoğunun eğitim seviyesinin ve tedaviye olan uyumlarının yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. KHC hastalarının cinsiyet farkının tedaviye yanıt ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).

Çalışma grubunda saptanan PON1 L/M55 ve PON1 Q/R192 genotip sıklıkları Tablo II'de, alel sıklığının tedaviye yanıtı ve yanıtı olmayan hastalara göre dağılımı ise Tablo III'te sunulmuştur. KHC'li hastaların PON1 L/M55 ve PON1 Q/R192 polimorfizmleri ile tedaviye yanıt/yanıtı olmayan durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo IV).

Tablo II. Çalışma Grubunda PON1 L/M55 ve PON1 Q/R192 Genotip Sıklığı

	Genotip	Sayı (%)	Toplam hasta sayısı
PON1 L/M55	LL (majör homozigot)	20 (40.8)	49
	LM (heterozigot)	23 (46.9)	
	MM (minör homozigot)	6 (12.2)	
PON1 Q/R192	QQ (majör homozigot)	26 (53.1)	49
	QR (heterozigot)	22 (44.9)	
	RR (minör homozigot)	1 (2)	

Tablo III. PON1 L/M55 ve PON1 Q/R192 Polimorfizminde Alel Sıklığının Tedaviye Yanıtlı ve Yanıtsız Hastalara Göre Dağılımı

Tedaviye yanıt (hasta sayısı)	PON1 L/M55 Sayı (%)		PON1 Q/R192 Sayı (%)		Toplam alel sayısı
	L aleli	M aleli	Q aleli	R aleli	
Yanıtlı (34)	45 (66.2)	23 (33.8)	52 (76.5)	16 (23.5)	68
Yanıtsız (15)	18 (60)	12 (40)	22 (73.3)	8 (26.7)	30

Tablo IV. Tedaviye Yanıtlı ve Yanıtsız Hasta Gruplarında PON1 L/M55 ve PON1 Q/R192 Polimorfizmlerinin Dağılımı

	Genotip (hasta sayısı)	Yanıtlı Sayı (%)	Yanıtsız Sayı (%)	p
PON1 L/M55	LL (20)	15 (75)	5 (25)	0.777
	LM (23)	15 (65.2)	8 (34.8)	
	MM (6)	4 (66.7)	2 (33.3)	
PON1 Q/R192	QQ (26)	19 (73.1)	7 (26.9)	0.622
	QR (22)	14 (63.6)	8 (36.4)	
	RR (1)	1 (100)	-	

Hastalarda, PON1 L/M55 ve PON1 Q/R192 polimorfizmlerinin birlikteliği değerlendirildiğinde; 8'inde LL/QQ, 11'inde LL/QR, 1'inde LL/RR, 12'sinde LM/QQ, 11'inde LM/QR ve 6'sında MM/QQ genotipleri saptanırken LM/RR, MM/QR ve MM/RR birlikteliği hiçbir hastada izlenmemiştir (Tablo V). PON1 L/M55 ve PON1 Q/R192 polimorfizm kombinasyonları ile tedaviye verilen yanıt/yanıtsızlık arasındaki ilişkinin istatistiksel analizi sonucu anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo V).

Tablo V. Tedaviye Yanıtlı ve Yanıtsız Hasta Gruplarında PON1 L/M55 ve Q/R192 Kombine Polimorfizmlerinin Dağılımı

Genotip kombinasyonu	Hasta sayısı	Yanıtlı Sayı (%)	Yanıtsız Sayı (%)	p değeri
LL/QQ	8	7 (87.5)	1 (12.5)	0.838
LL/QR	11	7 (63.6)	4 (36.4)	
LL/RR	1	1 (100)	-	
LM/QQ	12	8 (66.7)	4 (33.3)	
LM/QR	11	7 (63.6)	4 (36.4)	
LM/RR	0	-	-	
MM/QQ	6	4 (66.7)	2 (33.3)	
MM/QR	0	-	-	
MM/RR	0	-	-	
MM/RR	0	-	-	

TARTIŞMA

Son yıllarda, enfeksiyonlar ve kronik hastalıklar ile genler arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelik çok sayıda çalışmaya rastlanmaktadır²⁰⁻²². Yapılan araştırmalar, bir insan genomunda 10 milyonun üzerinde tek nükleotid polimorfizmi (TNP) olduğunu göstermiştir¹⁵. HCV ile enfekte hastalarda 19. kromozomda bulunan IL-28B gen bölgesindeki TNP'lerin, spontan iyileşme ve tedavi yanıtıyla olan yakın ilişkisi tespit edilmiştir^{12,14,23}. IL-28B haricinde HCV enfeksiyonu seyrinde (spontan iyileşme, progresyon veya tedaviye yanıt) birçok genetik polimorfizmin etkisi olduğuna dair yayınlar mevcuttur^{20,24-29}.

Paraoksonaz polimorfik dağılımı ırklar arasında farklılık göstermektedir ve bu da bireyler arasında varyasyona neden olmaktadır². Aynacioğlu ve arkadaşlarının³⁰ Türk toplumunda PON1 mutasyonlarını incelediği bir çalışmada; PON1 L/M55 polimorfizmi sırasıyla, LL= %52, LM= %39, MM= %9 (alel sıklığı; L= %72, M= %28), Q/R192 polimorfizmi ise, QQ= %49, QR= %40 ve RR= %11 (alel sıklığı; Q= %69, R= %31) olarak tespit edilmiştir. Mevcut sonuçlarla Türk toplumunda PON1 enzim aktivitesinin Kuzey ve Orta Avrupa'ya göre daha yüksek, Uzak Doğu'ya göre daha düşük olduğu rapor edilmiştir³⁰. Türkiye'de mesane ve over kanseri ile ilgili, kontrol gruplarını da içeren, polimorfizm-hastalık birlikteliği çalışmalarında, özellikle PON1 Q/R192 genindeki RR oranının %10 ve üzerinde tespit edildiği izlenmektedir^{31,32}. Bizim çalışmamızda PON1 L/M55 polimorfizminde belirgin bir fark saptanmazken, PON1 Q/R192 polimorfizminde RR genotipinde %2 ile diğer çalışmalara göre çok daha düşük bir oran saptanmıştır. Buna neden olarak; araştırmamızda spontan iyileşen hastalar (anti-HCV pozitif, HCV-RNA negatif) bulunmadığı için, RR genotipinin yüksek enzim aktivitesinden dolayı spontan iyileşen hastalarda daha fazla olabileceği ihtimali düşünülmektedir.

PON1'in hidrolitik aktivitesi, R alelinin kodlandığı proteinde Q aleline göre sekiz kat daha yüksektir³³. Ayrıca polimorfizm, serum protein konsantrasyonunu da etkiler.

Homozigot R bireylerin homozigot Q'ya göre daha yüksek enzim konsantrasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir³⁴. PON1'in L/M55 polimorfizmi, enzimin substratlarla olan ilişkisini etkilemez; enzim düzeyi ile ilişkili olup M alelini taşıyanlarda PON1 düzeyi daha düşüktür. L alelini taşıyanlarda ise enzim yapısı daha stabildir ve bu da yüksek serum PON1 seviyeleriyle olan ilişkisini kısmen açıklayabilir³⁵.

PON1 sadece lipoproteinlerle ilişkili peroksitlerin değil, aynı zamanda H₂O₂ üzerine de etkilidir³⁶. Hücre içinde ekzojen ve endojen kaynaklı oluşan serbest radikaller toksik açıdan çok önemlidir. Hepatositler normalde de sürekli olarak reaktif oksijen ürünlerine maruz kalırlar ve bunların zararlı etkilerinden antioksidan yollarla korunurlar. HCV enfeksiyonu sırasında nitrik oksit sisteminde ortaya çıkan düzensizliğin, kronik karaciğer hastalıklarında anahtar rolü olduğu düşünülmektedir³⁷. Yapılan çalışmalarda; karaciğerde sentezlendiği için, PON1'in kronik hepatitte aktivitesinin azaldığı ve bunun da oksidatif strese olan maruziyeti artırarak virusun etkisi sonucu oluşan karaciğer disfonksiyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir^{38,39}. Ülkemizde de, kronik hepatit ve sirozlu (HBV ve HCV'ye bağlı) hastalarla yapılan çalışmalarda, benzer şekilde PON1 seviyelerinin sağlıklı bireylere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir^{17,40,41}. Oksidatif stres; DNA ve RNA'da hasara ve karaciğer hücrelerinde ölüme neden olmakta, bunun sonucu olarak da KHC hastalarında enzimlerde yükselme, nekroinflamasyon, siroz ve hepatoselüler kanser (HSK) gelişmektedir^{7,42}. Bu sebeple hastanın antioksidan kapasitesi kronik karaciğer hastalığı gelişmesinde önemli rol oynayabilir.

Ferre ve arkadaşlarının¹⁶ 186 KHC'li hastayı içeren ve PON1 polimorfizminin hastalık ile birlikteliğini araştırdığı bir çalışmada; PON1 L/M55 polimorfizmi sırasıyla LL= %16, LM= %48, MM= %36; Q/R192 polimorfizmi ise QQ= %50, QR= %37 ve RR= %13 olarak tespit edilmiştir. Sağlıklı 386 gönüllüde ise, PON1 L/M55 polimorfizmi sırasıyla LL= %14, LM= %46, MM= %40; Q/R192 polimorfizmi ise QQ= %48, QR= %45 ve RR= %7 olarak bulunmuştur. PON1 L/M55 polimorfizminin hasta ve kontrol grubu arasında farklılık göstermediği ancak PON1 192 RR genotipinin hasta grubunda %13, kontrol grubunda ise %7 olarak tespit edildiği ve anlamlı bir farklılık olduğu belirtilmiştir (p< 0.05)¹⁶. Aynı çalışmada enzim aktivitesi de çalışılmış olup, RR genotipinde enzimin daha aktif olduğu tespit edilmiştir¹⁶. Araştırmacılar, KHC'li hastalarda RR genotipinin daha fazla görüldüğünü ifade etmişlerdir; ancak bir bireyin RR genotipine sahip olması onun HCV enfeksiyonuna sahip olacağı anlamına gelmemektedir. Ek olarak bahsedilen çalışmada, HCV enfeksiyonu olan gruba ait özellikler (HCV-RNA pozitifliği, tedavi durumu, tedaviye yanıt gibi) belirtilmediği, ayrıca enzim aktivitesi RR homozigot bireylerde daha yüksek olduğu için bu sonucun çelişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Ferre ve arkadaşlarının³⁸ çoğunluğunu (%73) HCV'ye bağlı kronik hepatit ve sirozlu-ların oluşturduğu hasta gruplarıyla yaptığı bir başka çalışmada; sirozlu grupta PON1 L/M55 polimorfizmi sırasıyla, LL= %44, LM= %44, MM= %12 (alel sıklığı; L= %66, M= %34), kronik hepatitli grupta; LL= %36, LM= %48, MM= %16 (alel sıklığı; L= %60, M= %40), kontrol grubunda ise; LL= %40, LM= %47 ve MM= %13 (alel sıklığı; L= %63, M= %37) olarak tespit edilmiştir. Sirozlu grupta PON1 Q/R192 polimorfizmi ise sırasıyla; QQ= %50, QR= %41, RR= %9 (alel sıklığı; Q= %70, R= %30), kronik hepatitli grupta;

QQ= %48, QR= %39, RR= %13 (alel sıklığı; Q= %68, R= %32) ve kontrol grubunda; QQ= %46, QR= %46, RR= %8 (alel sıklığı; Q= %69, R= %31) olarak belirlenmiştir. PON1 genotip dağılımı ile sirozlu, kronik hepatitli ve kontrol grubu arasında anlamlı bir ilişki saptanmazken, PON1 seviyeleri sirozlu ve kronik hepatitli hastalarda anlamlı derecede düşük tespit edilmiştir³⁸.

Çalışmamızda KHC'li hastaların PON1 L/M55 ve PON Q/R192 polimorfizmlerinin birlikteliği ile tedaviye verdiği yanıt/yanıtsızlık arasındaki ilişkinin ki-kare testi ile analizi sonucu anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo V). Tedaviye yanıt oranı; LL/QQ genotipi olan hastalarda 7/8, LL/QR genotipinde 7/11, LL/RR genotipinde 1/1, LM/QQ genotipinde 8/12, LM/QR genotipinde 7/11, MM/QQ genotipinde ise 4/6 olarak tespit edilmiş, hiçbir hastada LM/RR, MM/QR ve MM/RR birlikteliği izlenmemiştir. Aynacıoğlu ve arkadaşlarının³⁰ çalışmasındaki 41 kişilik (%11) RR grubunun hepsi aynı zamanda LL genotipine sahip bulunmuş ve MM taşıyan 34 (%9) kişinin 4 (%1)'ü QR iken, hiç MM/RR birlikteliği izlenmemiştir. Mackness ve arkadaşları⁴³ LL/RR genotipinin en yüksek aktivite gösteren PON1 alel birlikteliği olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda, RR genotipine sahip tek hastanın tedaviye yanıt vermiş olması, bu hastanın aynı zamanda LL genotipine de sahip olması ve LL/QQ genotipine sahip sekiz hastadan 7 (%87.5)'sinin tedaviye yanıt vermiş olmasının, istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da klinik olarak anlamlı bir veri olduğunu düşünmekteyiz.

IL-28B polimorfizminin KHC hastalarının tedavisi üzerindeki etki ile genetik temelli kişiselleştirilmiş tedavi için yeni bir kapı aralanmıştır^{14,15}. Konağın genetik özelliklerinin, HCV enfeksiyonunda spontan iyileşme, kronikleşme veya tedaviye yanıt üzerindeki etkisinin aydınlatılması ile ilgili çalışmalar yoğun olarak devam etmekle birlikte, PON1 polimorfizmi ile ilgili araştırmalar ne yazık ki şu an kısıtlı sayıdadır. Proteaz inhibitörleri ile ortaya çıkan tedavi maliyetleri ve yan etki profili göz önünde bulundurulduğunda, naif bir hastada IL-28B ve PON1 polimorfizmi tedavi öncesi değerlendirilip, güçlü bir IL-28B/PON1 varlığında belki de klasik tedaviye öncelik verilebilir. Kronik viral hepatitlerin tedavisindeki amaç; viral replikasyonun baskılanması, inflamatuvar yanıtı önleyerek hücre harabiyetinin yok edilmesi veya durdurulmasıdır. Tedavi arayışında antioksidan cevabı artırmak da yeni bir çıkış noktası olabilir. Sonuç olarak çalışmamızda, PON1 L/M55 ve PON Q/R192 polimorfizmlerinin tek başlarına veya birlikteliği ile KHC tedavisine verilen yanıt/yanıtsızlık arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hasta sayısının azlığının bunda payı olabileceğini ve daha geniş hasta gruplarında KHC ve PON1 polimorfizmleri bağlantısı üzerindeki çalışmaların devam etmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Ekmekçi ÖB, Donma O, Ekmekçi H. Paraoksonaz. Cerrahpaşa Tıp Derg 2004; 35(2): 78-82.
2. Rajkovic MG, Rumora L, Barisic K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. Biochem Med (Zagreb) 2011; 21(2): 122-30.
3. Hegele RA. Paraoxonase genes and disease. Ann Med 1999; 31(3): 217-24.
4. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. Free Radic Biol Med 2005; 38(2): 153-63.

5. Ferit M, Gürsu MÖ, Gülcü F. Koroner kalp hastaları ile etiyolojik risk faktörlerini taşıyan bireylerde paraoksonaz aktiviteleri ve fenotiplerinin araştırılması. *Fırat Üni Sağlık Bil Derg* 2003; 17(4): 237-44.
6. Koç HB, Kaçar Y. Paraoksonaz1 (Pon1) enzimi ve polimorfizmleri. *Arşiv Kaynak Tarama Derg* 2012; 21(1): 27-41.
7. Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med (Berl)* 2003; 81(12): 766-79.
8. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009; 46(2): 83-106.
9. Örmeci N. Hepatit C virusu, s: 319-34. Tabak F, Tosun S (ed), *Viral Hepatit 2013*. 2013, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, Ankara.
10. Syed GH, Amako Y, Siddiqui A. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21(1): 33-40.
11. Aydemir S. Kronik hepatit C tedavi rehberlerinin gözden geçirilmesi, s: 365-73. Tabak F, Tosun S (ed), *Viral Hepatit 2013*. 2013, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, Ankara.
12. Mueller T, Mas-Marques A, Sarrazin C, et al. Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2004; 41(4): 652-8.
13. Lange CM, Zeuzem S. IL28B single nucleotide polymorphisms in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 2011; 55(3): 692-701.
14. Orlent H, Reynaert H, Bourgeois S, et al; Belgian Association for the Study of the Liver. IL28B polymorphism and the control of hepatitis C virus infection: ready for clinical use? *Acta Gastroenterol Belg* 2011; 74(2): 317-22.
15. Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: The future of personalized HCV therapies. *Am J Gastroenterol* 2011; 106(1): 38-45.
16. Ferre N, Marsillach J, Camps J, et al. Genetic association of paraoxonase-1 polymorphisms and chronic hepatitis C virus infection. *Clin Chim Acta* 2005; 361(1-2): 206-10.
17. Aslan M, Horoz M, Nazligul Y, et al. Serum paraoxonase and arylesterase activities for the evaluation of patients with chronic hepatitis. *Int J Clin Pract* 2008; 62(7): 1050-5.
18. Hashemi M, Moazeni-Roodi AK, Fazaeli A, et al. The L55M polymorphism of paraoxonase-1 is a risk factor for rheumatoid arthritis. *Gen Mol Res* 2010; 9(3): 1735-41.
19. Hashemi M, Moazeni-Roodi AK, Fazaeli A, et al. Lack of association between paraoxonase-1 Q192R polymorphism and rheumatoid arthritis in southeast Iran. *Gen Mol Res* 2010; 9(1): 333-9.
20. Stättermayer AF, Scherzer T, Beinhardt S, Rutter K, Hofer H, Ferenci P. Review article: genetic factors that modify the outcome of viral hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39(10): 1059-70.
21. Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet* 2012; 13(3): 175-88.
22. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 2009; 10(4): 241-51.
23. Clark PJ, Thompson AJ. Host genomics and HCV treatment response. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27(2): 212-22.
24. Louagie HK, Brouwer JT, Delanghe JR, De Bruyere ML, Leroux-Roels GG. Haptoglobin polymorphisms and chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996; 25(1): 10-4.
25. Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position 238 is associated with chronic active hepatitis C infection. *J Med Virol* 1998; 54(3): 173-7.

26. Van Vlierberghe H, Delanghe JR, De Bie S, et al. Association between Cys282Tyr missense mutation and haptoglobin phenotype polymorphisms in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13(9): 1077-81.
27. Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J Hepatol* 2002; 36(2): 271-7.
28. Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, et al. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 2003; 38(6): 1468-76.
29. Saito T, Shinzawa H, Okumoto K, et al. Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317(2): 335-41.
30. Aynacıoğlu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Nacak M, Tapanyigit EE, Roots I. Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 157(3): 174-7.
31. Öztürk O, Kağnici OF, Öztürk T, et al. 192R allele of paraoxonase gene as a new marker for susceptibility to bladder cancer. *Anticancer Research* 2009; 29(10): 4041-6.
32. Arpacı A, Görmüş U, Dalan B, Berkman S, Isbir T. Investigation of PON1 192 and 55 polymorphisms in ovarian cancer patients in Turkish population. *In Vivo* 2009; 23(3): 421-4.
33. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996; 14(3): 334-6.
34. Mackness MI, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7(2): 69-76.
35. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107(5): 435-47.
36. Başkol G, Köse K. Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Derg* 2004; 26(2): 75-80.
37. Shah V, Lyford G, Gores G, Farrugia G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2004; 126(3): 903-13.
38. Ferre N, Camps J, Prats E, et al. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin Chem* 2002; 48(2): 261-8.
39. Ferre N, Marsillach J, Camps J, et al. Paraoxonase-1 is associated with oxidative stress, fibrosis and FAS expression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2006; 45(1): 51-9.
40. Keskin M, Dolar E, Dirican M, et al. Baseline and salt-stimulated paraoxonase and arylesterase activities in patients with chronic liver disease: relation to disease severity. *Intern Med J* 2009; 39(4): 243-8.
41. Duygu F, Tekin Koruk S, Aksoy N. Serum paraoxonase and arylesterase activities in various forms of hepatitis B virus infection. *J Clin Lab Anal* 2011; 25(5): 311-6.
42. Higgs MR, Chouteau P, Lerat H. 'Liver let die': oxidative DNA damage and hepatotropic viruses. *J Gen Virol* 2014; 95(Pt 5): 991-1004.
43. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol* 1997; 122(2): 265-8.