

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEPATİT C VİRUSU (HCV) İLE KRONİK İNFEKTE  
VE SİROZLU HASTA TAM KAN ÖRNEKLERİNDE HCV  
VE HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA İLE İLİŞKİLİ  
miRNA'LARIN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Zehra ÖKSÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN

MERSİN – 2012

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEPATİT C VİRUSU (HCV) İLE KRONİK İNFEKTE  
VE SİROZLU HASTA TAM KAN ÖRNEKLERİNDE HCV  
VE HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA İLE İLİŞKİLİ  
miRNA'LARIN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Zehra ÖKSÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
BAP-SBE FM (ZÖ) 2011-5 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 232

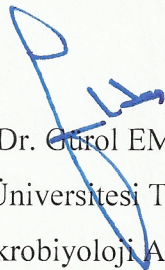
MERSİN – 2012

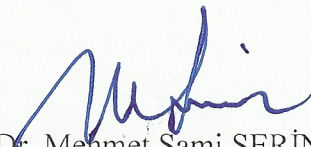
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “*Hepatit C Virus (HCV) ile Kronik İnfekte ve Sirozlu Hasta Tam Kan Örneklerinde HCV ve Hepatosellüler Karsinoma ile İlişkili miRNA’ların Ekspresyon Profillerinin Araştırılması*” başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

21/12/2012

Prof. Dr.  EMEKDAŞ  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı

  
Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi/Danışman

  
Yrd. Doç. Dr. Aylin DÖĞEN

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun <sup>25.12.2012 2012/392</sup> ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU





## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve desteğini hiç esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN'e ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ başta olmak üzere Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN'a, Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK'e, Sayın Prof. Dr. Nuran DELİALIOĞLU'a ve Sayın Doç. Dr. Feza OTAĞ'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimine başladığım ilk günden itibaren beni destekleyen ve akademisyen olma yolunda beni cesaretlendiren, bilgi ve tecrübeleriyle meslek hayatıma çok şey katan Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Aylin DÖĞEN'e, birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve tez çalışmam boyunca her türlü yardımını gördüğüm arkadaşım Uzman Engin KAPLAN'a, çalışma örneklerimin toplanması sırasında büyük emek ve sabırla yardımcı olan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Orhan SEZGİN'e, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi Sorumlusu Sayın Prof. Dr. Naci TİFTİK'e ve sorumlu teknisyen Sayın Güven GÜLEÇ başta olmak üzere bütün kan merkezi çalışanlarına, laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Mersin Üniversitesi Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans Öğrencisi Hikmet ÇELİK'e ve Uzman Biyolog Başak YAVUZ'a teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte ve hayatımın her anında sevgileriyle, bilgileriyle, hayat tecrübeleriyle, maddi ve manevi olarak yanımda olan, onların çocuğu olmaktan gurur duyduğum babam Arif ÖKSÜZ ve annem Fatma ÖKSÜZ'e, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim kardeşim Ömer Faruk ÖKSÜZ, ablam Betül ÖKSÜZ ERGÜL ve eniştem Bilal ERGÜL'e, varlığıyla hayatımıza renk katan ailemizin en küçük üyesi Eylül ERGÜL'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

<b>Kabul ve Onay</b>	iii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b>	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	viii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	ix
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	x
<b>ÖZET</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>1.GİRİŞ</b>	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	
2.1. Hepatit C Virusunun Tarihçesi, Genom Yapısı, Proteinleri, Replikasyonu, Genotipleri ve Tedavisi	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Hepatit C Virusunu	
2.1.2.1. Virusun Yapısı	6
2.1.2.2. Genom Yapısı	7
2.1.2.3. Virus Proteinleri	8
2.1.2.4. Yaşam Döngüsü ve Replikasyonu	11
2.1.2.5. HCV Genotipleri	14
2.1.3. Patogenez	16
2.1.4. Klinik Belirti ve Bulgular	
2.1.4.1. Akut İnfeksiyon	18
2.1.4.2. Kronik İnfeksiyon	19
2.1.5. Epidemiyoloji	
2.1.5.1. Bulaşma Yolları	20
2.1.5.2. Dünyada HCV İnfeksiyonu	22
2.1.5.3. Türkiye’de HCV İnfeksiyonu	23
2.1.5.4. HCV ilişkili Hepatosellüler Karsinoma Epidemiyolojisi	25

2.1.6. Tedavi	26
2.1.7. Koruma ve Kontrol	27
2.1.8. Tanı	28
2.1.8.1 Serolojik Testler	29
2.1.8.2. Nükleik Asit Testleri	30
2.1.8.2.1. Kalitatif Testler	30
2.1.8.2.2. Kantitatif Testler	31
2.2. Viral Onkogenezi	
2.2.1. Kanser ve Oluşum Mekanizmaları	33
2.2.2. Onkojenik Viruslar	34
2.2.3. HCV'nin Hepatosellüler Karsinoma ile İlişkisi	36
2.3. miRNA ve HCV	
2.3.1. miRNA'lar	39
2.3.2. miRNA Biyogenezi	40
2.3.3. Karaciğer gelişimi ve hastalıklarında miRNA'lar	41
2.3.4. Antiviral savunmada miRNA'lar	42
2.3.5. Karaciğerin viral infeksiyonlarında miRNA'lar	42
2.3.6. miRNA'ların HCV infeksiyonundaki rolü	43
2.3.7. Karaciğer fibroz/sirozunda miRNA'lar	45
2.3.8. Hepatik Stella hücrelerinde miRNA'lar	46
2.3.9. Hepatosellüler karsinomada miRNA'lar	47
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	
3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler	51
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	
3.2.1. Plazma Eldesi İçin Kullanılan Malzemeler	52
3.2.2. miRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Malzemeler	52
3.2.3. cDNA Eldesi İçin Kullanılan Malzemeler	53
3.2.4. Pre-amplifikasyon İçin Kullanılan Malzemeler	54
3.2.5. miRNA Analizi İçin Kullanılan Malzemeler	55
3.2.6. Kullanılan Cihazlar	55
3.3. Yöntemler	
3.3.1. Örneklerin Hazırlanması ve Analizi	56

3.3.1.1. miRNA Analizi İçin Plazma Eldesi	56
3.3.1.2. miRNA İzolasyonu	57
3.3.1.3. cDNA Eldesi ve Pre-amplifikasyon	58
3.3.2. Dynamic Array 96.96'nın Hazırlanması ve miRNA analizi	61
<b>4.BULGULAR</b>	
4.1. KHC- Kontrol Sonuçlarının Karşılaştırılması	64
4.2. Siroz- Kontrol Sonuçlarının Karşılaştırılması	66
4.3. HSK- Kontrol Sonuçlarının Karşılaştırılması	69
<b>5. TARTIŞMA</b>	71
<b>6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER</b>	78
<b>7. KAYNAKLAR</b>	80
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	94

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> HCV modeli	6
<b>Şekil 2.2.</b> HCV genomunun yapısı	8
<b>Şekil 2.3.</b> HCV genomu tarafından kodlanan proteinler	10
<b>Şekil 2.4.</b> HCV'nin yaşam döngüsü	14
<b>Şekil 2.5.</b> HCV genotiplerinin küresel dağılımı	16
<b>Şekil 2.6.</b> Ülkelerin HCV dağılım haritası	23
<b>Şekil 2.7.</b> Tümör viruslarının kanser gelişim mekanizmaları	36
<b>Şekil 2.8.</b> Tümör baskılayıcı proteinler ile ilişkili olduğu düşünülen HCV proteinleri	38
<b>Şekil 2.9.</b> HCV ile kronik infekte HSK oluşumunun olası hücresel yolları	38
<b>Şekil 2.10.</b> miRNA biyogenezi	40
<b>Şekil 2.11.</b> Hepatik stellata hücre farklılaşmasında miRNA'ların rolü	47



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> HCV tarihinin kilometre taşları	5
<b>Çizelge 2.2.</b> HCV proteininin özellikleri	10
<b>Çizelge 2.3.</b> HCV bulaş yolları ve düzeyleri	20
<b>Çizelge 2.4.</b> Ülkemizdeki kan dönörlerin de anti-HCV prevalansı	24
<b>Çizelge 2.5.</b> HCV testinin önerildiği bireyler	28
<b>Çizelge 2.6.</b> İnsan kanseri ile ilişkili viruslar	35
<b>Çizelge 2.7.</b> miRNA'ların HCV enfeksiyonundaki anormal ekspresyonları	44
<b>Çizelge 2.8.</b> miRNA'ların fibroz'daki anormal ekspresyonları	46
<b>Çizelge 2.9.</b> miRNA'ların HSK'daki anormal ekspresyonları	50
<b>Çizelge 3.1.</b> Panel A miRNA listesi	51
<b>Çizelge 3.2.</b> Panel B miRNA listesi	51
<b>Çizelge 4.1.</b> HCV/Kontrol grubu eksprese olmayan miRNA'lar	64
<b>Çizelge 4.2.</b> HCV/Kontrol grubu eksprese olan miRNA'lar ve anlamlılıkları	65
<b>Çizelge 4.3.</b> Siroz/Kontrol grubu eksprese olan miRNA'lar ve anlamlılıkları	67
<b>Çizelge 4.4.</b> Siroz/Kontrol grubu eksprese olmayan miRNA'lar	68
<b>Çizelge 4.5.</b> HSK/Kontrol grubu eksprese olan miRNA'lar ve anlamlılıkları	69
<b>Çizelge 4.6.</b> HSK/Kontrol grubu eksprese olmayan miRNA'lar	70
<b>Çizelge 5.1.</b> HSK'nın erken tanısında biyomarkır olarak kullanılacak miRNA'ların hasta gruplarındaki ekspresyon profilleri	77

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AGO 2</b>	Argonaute 2 proteini
<b>AHC</b>	Akut hepatit C
<b>ALT</b>	Alanin Aminotransferaz
<b>bDNA</b>	Dallanmış DNA
<b>BOC</b>	Boceprevir
<b>C</b>	Kor proteini
<b>CDK</b>	Siklin bağımlı kinazlar
<b>cDNA</b>	Komplementer deoksiribonükleik asit
<b>CLDN</b>	Claudin aile üyesi
<b>CTL</b>	Sitotoksit T lenfosit
<b>DGCR8</b>	DiGoege Syndrome Critical Region 8
<b>DLC-1</b>	Deleted in Liver Cancer 1
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>E1 ve E2</b>	HCV zarf proteinleri
<b>EIA</b>	Enzim İmmuno Assay
<b>EBV</b>	Epstein-Barr Virus
<b>ER</b>	Endoplazmik retikulum
<b>Exp5</b>	Exportin-5
<b>FDA</b>	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>FRET</b>	Floresan Rezonans Enerji Transfer
<b>GAGs</b>	Glikozaminoglikanlar
<b>HAV</b>	Hepatit A virusu
<b>HBV</b>	Hepatit B virusu
<b>HCV</b>	Hepatit C virusu
<b>HGV</b>	Hepatit G virusu
<b>HIV</b>	İnsan immün yetmezlik virusu
<b>HPV</b>	Human Papilloma Virus
<b>HSK</b>	Hepatosellüler Karsinoma
<b>Huh-7</b>	Human hepatoma line-7

<b>HTLV-1</b>	İnsan T Hücre Lenfotropik Virus
<b>HVR</b>	Hiper değişken bölge
<b>IFN</b>	İnterferon
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	İnterferon gamma
<b>IgG</b>	İmmünglobülin G
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>IRES</b>	İnternal ribosomal entry site
<b>İV</b>	İntravenöz
<b>KHC</b>	Kronik hepatit C
<b>KSHV</b>	Kaposi sarkomu ilişkili Herpesvirus
<b>LDL</b>	Düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>LDLR</b>	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü
<b>LİPA</b>	Line probe assay
<b>MCPyV</b>	Merkel hücreli polimavirus
<b>miRNA</b>	MikroRNA
<b>MBL</b>	Mannoz Bağlayıcı Lektin
<b>NANBH</b>	Non-A, non-B hepatit
<b>NASH</b>	Alkolik olmayan steatohepatit
<b>NK</b>	Doğal öldürücü hücre
<b>NS</b>	Yapısal olmayan
<b>NTPaz</b>	Nükleosid trifosfat
<b>ORF</b>	Açık okuma bölgesi
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>Peg-<i>INF-<math>\alpha</math></i></b>	Pegile İnterferon $\alpha$
<b>Pre-miRNA</b>	Prekürsör RNA
<b>Pri-miRNA</b>	Primer RNA
<b>PTEN</b>	Fosfotaz ve tensin homolog
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RBV</b>	Ribavirin
<b>RFLP</b>	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
<b>RIBA</b>	Recombinant immunoblot assay
<b>RISC</b>	RNA induced silencing complex

<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>RNA Pol II</b>	RNA Polimeraz II
<b>RT-PCR</b>	Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SRB1</b>	Toplayıcı reseptör sınıf B tip 1
<b>SsRNA</b>	Single-standed RNA
<b>TGF</b>	Transforming growth factor
<b>Th</b>	Yardımcı T lenfosit
<b>TLR3</b>	Toll-like receptor 3
<b>TMA</b>	Transkripsiyon aracılı amplifikasyon
<b>TVR</b>	Telaprevir
<b>UTR</b>	Translasyona uğramayan bölge
<b>Zn<sup>+2</sup></b>	Çinko

## ÖZET

### Hepatit C Virusu (HCV) ile Kronik İnfekte ve Sirozlu Hasta Tam Kan Örneklerinde HCV ve Hepatosellüler Karsinoma ile İlişkili miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin Araştırılması

Hepatit C infeksiyonu ciddi bir küresel sağlık sorunu olup tüm dünya'da 170 milyon kişinin bu virusun taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir. Bu patojene maruz kalmış bireylerin büyük bir kısmında kronik hepatit C (KHC) infeksiyonu gelişmekte, buna bağlı olarak tablo siroz ve hepatosellüler karsinoma (HSK) gibi ciddi son aşama karaciğer komplikasyonları ile sonuçlanabilmektedir. Mevcut tedavi seçenekleri henüz suboptimal olup günümüze kadar efektif bir aşısı geliştirilememiştir. HSK insidansı ve mortalitesi tüm dünyada her geçen gün artmakta ve bu süreci önceden belirleyebilecek spesifik noninvaziv prognostik markır sayısı yok denecek kadar azdır. MikroRNA (miRNA)'lar 17-25 nt. uzunluğunda olan genetik kod taşımayan ve sıklıkla kanser olmak üzere birçok hastalıkta ekspresyon düzensizlikleri gösteren ve bu değişiklikleri hastalıkların tanı ve prognozunda markır olarak kullanılacak özellikte spesifikite gösteren küçük RNA yapılarıdır. Bu çalışmada kronik hepatit C (KHC)'li, siroz'lu ve HSK'lı hasta plazma örneklerinde toplam 60 miRNA'nın ekspresyon profilleri incelenerek, HSK öncesi erken tanı sağlayabilecek potansiyele sahip olan miRNA'ların olası varlığı araştırılmıştır. Çalışmaya 26 KHC'li, 30 sirozlu, 8 HSK'lu hasta ve 30 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu dahil edilmiş ve bu bireylere ait plazma örneklerinde 60 miRNA'nın ekspresyon profilleri 96.96 Dynamic Array IFC'lerin kullanıldığı yüksek kapasiteli qRT-PCR ile araştırılmıştır. Bu çalışmada hasta ve kontrol grubu ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında miR-223-3p, miR-17-5p ve miR-24-3p'nin her 3 hasta grubunda da birbirine paralel bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon değişiklikleri gösterdikleri ve HSK'nın erken tanısını sağlayabilecek prognostik biyomarkırlar olabilecekleri belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hepatit C virus, Siroz, Hepatosellüler karsinoma, MikroRNA, Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

## **ABSTRACT**

### **Investigation of miRNA Expression Profiles related with Hepatitis C Virus (HCV) and Hepatocellular Carcinoma in Whole Blood Samples of patients with Chronically infected HCV and Cirrhosis**

**Hepatitis C virus (HCV) infection is a serious global health problem with an estimate of 170 million carriers worldwide. Most individuals exposed to this pathogen develop chronic hepatitis C (CHC) infection, which may result in severe liver complications as well as endstage liver diseases including cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Current treatment options are suboptimal with no effective vaccines available to date. HCC incidence and mortality rates are increasing day by day all over the world, and there are a few noninvasive prognostic markers to pre-determine the process. MicroRNAs (miRNAs), 17- to 25-nucleotide noncoding RNAs that are frequently dysregulated in HCC, have shown great promise as tissue-based markers for HCC diagnosis and prognosis. In this study, plasma samples of patients with chronic hepatitis C (CHC), cirrhosis and HCC examined for a total of 60 miRNA expression profiles to provide potentially important noninvasive biomarkers to be used for early diagnosis of HCC. The study was conducted with 26 samples of CHC patients, 30 samples of cirrhosis patients, 8 samples of HCC patients and 30 samples of healthy controls. Expression profiles of 60 miRNA were investigated with high capacity qRT-PCR by using 96.96 dynamic array IFCs. In this study, when expression levels of 60 miRNA were compared between 3 patients group and control groups, miR-223-3p, miR-17-5p and miR-24-3p were found to be potentially important noninvasive biomarkers for early detection of HCC.**

**Key Words: Hepatitis C virus, Cirrhosis, Hepatocellular Carcinoma, MicroRNA, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

# 1. GİRİŞ

1989'da NANBH (non-A, non-B Hepatit) hepatit ile infekte edilmiş bir şempanzenin serumunda viral tamamlayıcı DNA (komplementer deoksiribonükleik asit: cDNA) klonunun izole edilmesi ile NANBH genomunun ilk identifikasyonu sağlanmış ve HCV (Hepatit C virusu) olarak adlandırılmıştır (1).

*Flaviviridae* ailesinin Hepacivirus genusuna dahil edilen HCV genomunun yaklaşık 9400 nükleotid uzunluğunda, pozitif polariteli, tek iplikçikli lineer bir yapısı vardır. HCV küremsi, lipid zarflı ve 30-60 nm büyüklüğünde hepatotropik bir RNA virusudur (2).

HCV RNA'sı; kor (C), zarf proteinleri (E1 ve E2) ve yapısal olmayan proteinlerden oluşmaktadır (3). Bu proteinler HCV'nin yaşam döngüsünde ve replikasyonunda önemli görevler üstlenirler (4).

HCV genomu, RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimi aktivitesinin tamir yeteneğinden yoksun olmasından dolayı yüksek derecede genetik çeşitlilik göstermektedir (5). Filogenetik analizler temelinde HCV'nin %35'lere varan sekans farklılığı gösteren 6 ana genotip (1 ile 6 arası) ve sekans farklılığı %20'lere varan 50'den fazla subgenotipi tanımlanmış olup, bu genotipler kendilerine özgü bir coğrafi dağılım göstermektedirler (6).

HCV enfeksiyonu tüm dünyada yaygındır. Tüm dünyada 130 ila 170 milyon kişinin HCV pozitif olduğunu bilinmektedir ve 35 milyondan fazla kişi her yıl HCV ile ilişkili karaciğer hastalıklarından ölmektedir (7). İskandinavya ülkeleri ve İngiltere HCV prevalansının en düşük olduğu ülkeler iken en yüksek prevalans ise yaklaşık %15-20 oranla Mısır'dan bildirilmiştir (8).

Hepatit C virusu temel olarak infekte donörden solid organ transfüzyonu, intravenöz (İV) uyuşturucu kullanımı, iğne batması gibi temaslar, kan ve kan ürünleri transfüzyonu, infekte anneden bebeğine bulaş, infekte partnerle cinsel ilişki gibi yollarla bulaşabilmektedir (9).

HCV viral hepatit C enfeksiyonuna neden olmaktadır. Viral hepatit C geniş klinik spektrumlu ve kronikleşme eğilimli bir enfeksiyondur. HCV'nin neden olduğu karaciğer hastalığının şiddeti normal karaciğer parametrelerine sahip asemptomatik



kronik infeksiyondan, hızlı bir şekilde siroz ve hepatosellüler karsinomaya (HSK) yönelebilen şiddetli kronik hepatite kadar geniş klinik dağılım gösterir (10).

Akut hepatit döneminde hastaların yaklaşık %15-20'si tam olarak iyileşirken, geri kalanında hastalık kronikleşir (11). Kronik hepatit C olgularının büyük çoğunluğunda olay bu evrede kalmakta ve siroz gelişmemekte ancak %20-30 olguda hepatik fibrozis, bunun sonucunda siroz ve/veya HSK gelişmektedir (12). Sirotik evredeki Hepatit C'li hasta HSK insidansı %3 civarındadır (13).

Hepatosellüler karsinoma genellikle uzun bir süreç sonunda gelişmektedir ancak tanımlanmış kanser hastalarında HCV infeksiyonunun ilerleyişi altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir (14).

DNA hasarı için potansiyel ve oksidatif stres ile ilişkili uzun süreli hepatik inflamasyon ve sirozun varlığını da içeren dolaylı mekanizmaların kanser gelişimine katkısı muhtemeldir. Ancak HCV'nin protein ekspresyonlarının doğrudan onkogenik olabileceği düşünülmektedir (15).

Birçok kanser türünde olduğu gibi HSK'da da p53 ve Rb (Retinoblastoma) tümör süpresör proteinleri sıklıkla mutasyona uğramaktadır (16). HCV proteinlerinin p53 ve Rb ile olan potansiyel etkileşimleri, aktif p53 ve Rb yollarını gerektiren hücre döngü kontrol mekanizmalarının etkili çalışmamasına neden olması ve bu etkileşimler sonucunda karaciğer kanserine doğru yönelimin başladığı düşünülmektedir (17).

Virus infeksiyonları ile ilişkili olan kanser çeşitlerinin tanısında birçok serolojik markır bulunmakta, ancak kanserin erken tanısında yeni yöntem ve markırlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda moleküler temelli çalışmalarla kanser türlerinin erken tanısı için yeni markır arayışlarını hedefleyen çalışmalar yapılmaktadır (18).

İlk defa bir toprak solucanı olan *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilen miRNA'ların kanserin erken tanısında markır olarak kullanılabileceğine dair çalışmalar vardır. miRNA'lar endojen olarak sentezlenen yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda olan küçük RNA'lardır. Translasyonel represyon veya klevaj sonucu degradasyon yolu ile gen ekspresyonunun regülasyonunda görev alırlar (19). Çeşitli hücre fonksiyonlarda yer alan miRNA disregülasyonunun anlaşılması ile beraber kanser ve viral faktörler ile indüklenen insan hastalıkları ile olan ilişkileri de her geçen gün daha net bir şekilde anlaşılmaktadır (20, 21).

Diğer birçok virusun replikasyon stratejisinde olduğu gibi HCV de, hücrel miRNA'lar ile etkileşmektedir. HCV hayat siklusunda yer alan bu miRNA'lardan birisi miR-122'dir (20, 21). İlginç bir şekilde miR-122'nin, HCV'nin viral üretimi ve etkin replikasyonu için gerekli bir konak faktörü olduğu tanımlanmıştır (22, 23). Bununla birlikte miR-122'nin HCV amplifikasyonundaki aracılık fonksiyonu net olarak bilinmemekle beraber bu mikroRNA'nın HCV RNA birikimine katkı sağladığı ve bundan dolayı da viral amplifikasyon hızının arttığı önerilmektedir (22, 24).

İnsan kanserlerinde değişikliğe uğramış miRNA düzeyleri oldukça değişken olmakla beraber, tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin miRNA ekspresyonu aracılı regülasyonlu insan kanserlerinin tamamına yakınında gerçekleşmektedir (25). Hepatosellüler karsinomada miRNA ekspresyon paternlerinin karaciğer tümör ve normal komşu doku ve karaciğer sirozu ve normal komşu doku karşılaştırmalarının yapıldığı erken dönem çalışmaları, hastalık ile korele bir şekilde miRNA ekspresyon düzeylerinde spesifik değişiklikler gerçekleştiğini ortaya koymuştur (26, 27).

Çalışmamızdaki amaç, KHC, siroz ve HSK tanısı almış hastaların serumlarında miRNA ekspresyon düzeylerinin araştırılması ve HCV ile ilişkili HSK'nın erken tanısına katkı sağlayabilecek, prediktif bir değere sahip miRNA'ların belirlenmesidir. Bu çalışma ile elde edilen bilgi ve bulgular, ülkemiz ve tüm dünya için halen önemli bir sağlık sorunu olan HCV ile ilişkili HSK gelişimi ve etyolojinin aydınlatılmasına yönelik, erken tanıya yardımcı olabilecek önemli katkılar sağlayabilme niteliğindedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hepatit C Virusunun Tarihçesi, Genom Yapısı, Proteinleri, Replikasyonu, Genotipleri ve Tedavisi

#### 2.1.1. Tarihçe

Viral hepatitler, Hipokrat zamanından beri kaydedilen tarihin bir parçası olmuş ve yüzyıllar boyunca ciddi kayıplara, ölümlere yol açmıştır (28). 1940'lerden itibaren Hepatit A (HAV) ve Hepatit B (HBV) olmak üzere iki tip viral hepatitin varlığı ortaya çıkmıştır (29). 1965 yılında Blumberg HBV yüzey antijenini, 1973 yılında Feinstone ve ark. HAV infeksiyonundan sorumlu ajanı bulmuşlardır (30). Bu iki hepatit tipine özgü antijenik yapıların belirlenmesi, serolojik testlerin geliştirilmesi ve kullanılmaya başlaması özellikle transfüzyonla bulaşan hepatitler alanında daha başka etkenlerin varlığından kuşulanılmasına yol açmıştır. Böylece, hepatit A ve B'nin identifikasyonundan sonra 1970'li yılların başında non-A, non-B Hepatit (NANBH) kavramı gelişmiştir (31). NANBH viral hepatit ilk Hepatit A ve B virusları için spesifik serolojik testlerin ortaya çıkması ile 1975 yılında tespit edilmiştir. Transfüzyon ile ilişkili hepatit vakalarının çoğunda bu virusların herhangi birinin serolojik markırlarının olmadığı bulunmuştur (32).

NANBH viral hepatitin dönüm noktası, 1989'da NANBH hepatit ile infekte edilmiş bir şempanzenin serumunda viral tamamlayıcı DNA (komplementer deoksiribonükleik asit: cDNA) klonunun izole edilmesidir. Böylece NANBH genomunun ilk identifikasyonu sağlanmış ve Hepatit C virusu (HCV) olarak adlandırılmıştır (1). Bu gelişmenin ardından 1990'lı yılların başlarında anti-HCV serolojik çalışmaları ile Enzim Immün Assay (EIA) ve duyarlılığı daha güçlü olan Recombinant Immunoblot Assay (RIBA) geliştirilmiştir (Çizelge 2.1) (33).

HCV'nin tanımlanmasından sonra virusun moleküler yapısını belirlemede pek çok gelişme olmuştur. Özellikle 2000'li yıllarda RNA'nın protein kodlamayan kısmı olan miRNA (mikroRNA)'nın keşfi ile ilk doku spesifik miRNA örneklerinden biri olan

mikroRNA-122 (miR-122)'nin HCV replikasyonunun sağlanmasında önemli rol oynadığı bulunmuştur (34).

Bugün hala HCV'nin genomu, siroz ve hepatosellüler karsinoma ile ilişkisi araştırılmaktadır.

**Çizelge 2.1.** Viral Hepatit tarihinin önemli kilometre taşları (28)

---

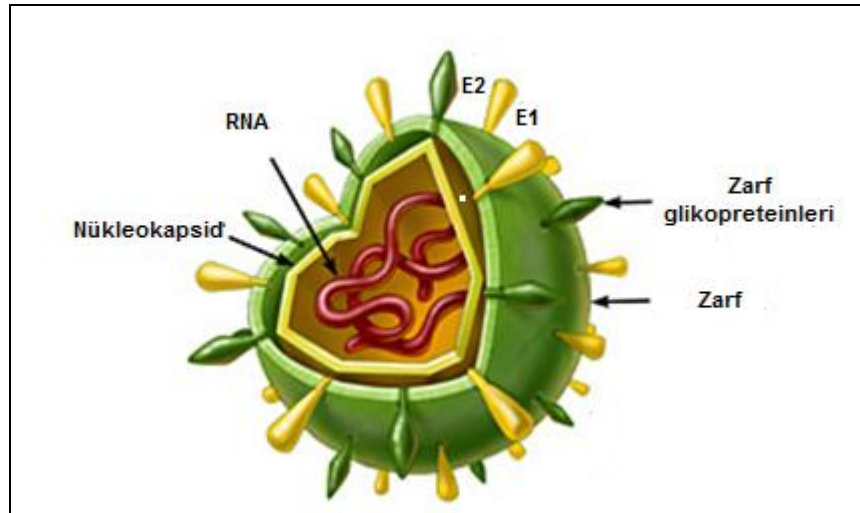
<b>1965</b>	HBV yüzey antijenini identifikasyonu (Blumberg)
<b>1973</b>	HAV'nın identifikasyonu (Feinstone)
<b>1975</b>	Hepatit evrelerinin tanımlanması (Mosley)
<b>1975</b>	'Non-A, Non-B hepatit' varlığının önerisi (Feinstone)
<b>1977</b>	Bulaşıcı bir ajan olduğunun belgelenmesi (Hoofnagle)
<b>1986</b>	Alfa interferonun tedavi edici etkisinin ilk kanıtı (Hoofnagle)
<b>1989</b>	Hepatit C Virusunun identifikasyonu (Choo)
<b>1990</b>	Anti-HCV testlerinin kliniğe girmesi

---

## 2.1.2 Hepatit C Virusu

### 2.1.2.1. Virusun yapısı

HCV küresel, lipid zarflı ve 30-60 nm büyüklüğünde hepatotropik bir RNA virusudur (2). HCV RNA'sı; kor, zarf proteinleri (E1 ve E2) ve yapısal olmayan proteinlerden oluşmaktadır (Şekil 2.1). Elektron mikroskobu ile görüntülenen HCV'nin, zarfı delerek çıkan ince dikensi yapılar taşıyan lipoprotein bir kılıfa sahip olduğu ve bu kılıfın büyük olasılıkla, ikozahedral simetrik 30-35 nm çapında bir nükleokapsidi çevrelediği anlaşılmıştır (3). Klonlanan HCV genomlarının nükleotid ve aminoasit sekanslarının incelenmesi ile bu virusun hem hayvan pestiviruslarına (*Bovine diarrhoea virus*) hem de insan flaviviruslarına (*Yellow fever virus*, *Dengue fever virus*) ve hepatit G virusu (HGV)'na akraba olabileceğini göstermiştir (6). Günümüzde HCV genetik organizasyonu ve sentezlediği proteinler nedeniyle *Flaviviridae* familyasına dahil edilmesine rağmen genetik farklılığından dolayı Hepacivirus adında ayrı bir cins olarak sınıflandırılmıştır (6, 35).



Şekil 2.1. HCV modeli (36)

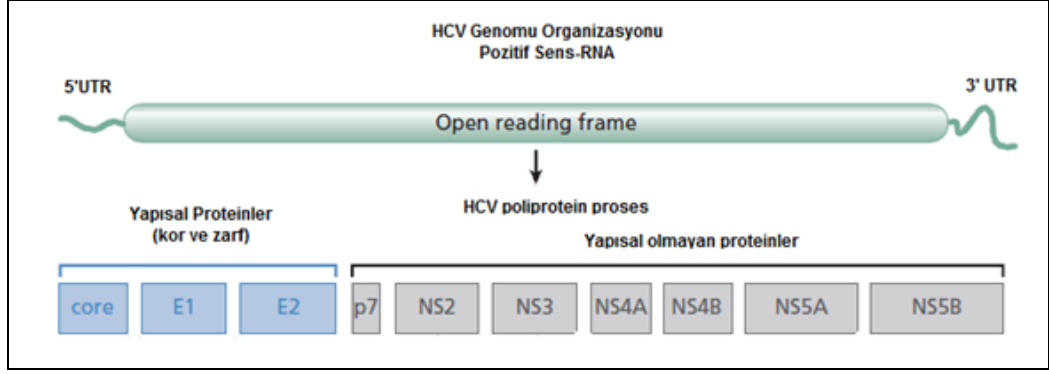
### 2.1.2.2. HCV'nin Genom Yapısı

HCV genomunun yaklaşık 9400 nükleotid uzunluğunda, pozitif polariteli, tek iplikçikli lineer bir yapısı vardır. Genomun 5' ve 3' uçlarında translasyona uğramayan (Untranslated Region: UTR) bölgeler yer alır. Bu bölgelerin arasında uzunluğu 3008-3030 aminoasit arasında değişen öncü bir poliproteini kodlayan açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame: ORF) bulunmaktadır. Bu protein daha sonra konak ve virus enzimleri tarafından posttranslasyonel işleme tabi tutularak virusun yapısal olan ve olmayan proteinlerini ve enzimlerini oluşturur (37).

Genomun 5' UTR bölgesi içinde viral RNA'nın endoplazmik retikuluma (ER) bağlanmasına yardımcı olan ve böylece translasyonun başlamasını sağlayan "Internal Ribosomal Entry Site" (IRES) adı verilen bir bölge mevcuttur. Başlangıçtaki 29 nükleotid hariç, 5'-UTR'nin tamamı bu işlevde yer almakta, 'IRES'ı oluşturmaktadır (38). Buna karşılık ilk 23 nükleotidin, translasyonu baskılayıcı rolü olduğu sanılmaktadır. Bu nedenle bu bölge iyi korunmuştur ve tanısal yöntemler için kullanışlı bir hedef olmuştur (39).

ORF'nin kodladığı poliprotein amino ucunda yapısal (structural) proteinler yer alır. Virion yapısına katılmayan (Non-Structural: NS) diğer proteinler ise karboksi ucuna doğru dizilirler. Genler şu şekilde sıralanır: 5'-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3' (Şekil 2.2). Yapısal bölge 21-kD'luk kor (C) proteini ve iki zarf proteininden (E1 ve E2) oluşur. E1 ve E2 genleri, iki zarf glikoproteini kodlarlar: gp35 ve gp70. Arada p7 proteinin oluşumuna yol açan bir kesilme olur. Bu proteinin hidrofobik ve membranla birlikte olduğu bilinmektedir (40). HCV'nin 6 tane yapısal olmayan proteini vardır. Flaviviruslarda bulunan NS1 bölgesi HCV'de bulunmaz (41). Yapısal olmayan proteinler, NS2 dışında viral RNA replikaz kompleksi oluşturur ve replikasyonda rol alırlar (42).

3' UTR bölgesi yaklaşık 27-54 nükleotidi kapsamaktadır. HCV'nin farklı genotiplerine göre değişiklik gösterse de bu bölge poly-U ya da poly-A ile sonlanmaktadır (43). Poly-U bölgesinden sonra 98 baz uzunluğunda 3'-X dizisi bulunur ve bu bölgenin viral genomun replikasyon başlangıcında önemli rol aldığı düşünülmektedir (44).



Şekil 2.2. HCV genomunun yapısı (4)

### 2.1.2.3. Virus proteinleri

HCV proteinleri yapısal ve yapısal olmayan proteinler olarak incelenir (Şekil 2.3) (Çizelge 2.2).

#### HCV'nin Yapısal Proteinleri

**Kor Proteini (Core: C):** HCV'nin ilk 191 aminoasitlik kısmını oluşturur ve hidrofobik olarak 3 alana ayrılır. 21 kD ağırlığındaki kor proteininin en önemli özelliği viral nükleokapsidi oluşturan RNA bağlama proteini olmasıdır (45). Kor proteini hepatokarsinogenezis ve karaciğer yağlanması ile doğrudan ve dolaylı olarak ilişkilendirilmiştir. Birçok hücre proteinle etkileşime girer ve gen transkripsiyonu, lipit mekanizması, apoptoz gibi çok sayıda biyolojik fonksiyona katılır (46).

**Zarf Proteinleri (E1 ve E2):** Bu proteinler hücreye girişte önemli rol oynarlar. Zarf proteinlerinin hücre membran reseptör proteinlerini tanıyarak hücreye girişe aracılık ettiği düşünülmektedir (47). E2 proteini, 2 yüksek düzeyde değişkenlik gösteren bölge (Hypervariable Regions: HVR1 ve HVR2) içerir. Bu bölgeler etkin nötralize edici antikorlar için sorun yaratmaktadır. E2, aynı zamanda HCV'nin varsayılan reseptörü olan, CD81'e bağlanma bölgesi içermektedir (48).

**p7:** E2 ve NS2 proteinleri arasında yer alan 63 aminoasitlik bir polipeptiddir. RNA replikasyonu için gerekli değildir. Bu protein viroporin olarak adlandırılan bir protein grubu ile benzer özelliklere sahiptir ve bu özelliği ile virus enfeksiyonunda



önemli rol oynayan iyon kanallarını oluşturarak viral parçacık olgunlaşması ve salınımı için görev yapmaktadır (49).

### **HCV'nin Yapısal Olmayan Proteinleri**

**NS2:** 21-23 kD ağırlığında transmembran proteindir. Bu protein *in vitro* ve *in vivo* olarak viral döngünün tamamlanması için gereklidir. NS2 proteini, çinko ( $Zn^{+2}$ ) bağımlı bir metalloproteazı kodlar ve böylece replikasyon sırasında yapısal olmayan proteinleri poliproteinden ayırıştırır (50).

**NS3:** 63 kD ağırlığında çok fonksiyonlu bir proteindir. Molekülün amino ucunda serin proteaz aktivitesine, karboksi ucunda ise nükleosid trifosfat (NTPaz)/helikaz aktivitesine sahiptir. NS3 proteininin enzimatik aktivitesi RNA replikasyonu için vazgeçilmezdir. Serin proteaz aktivitesi ile replikasyon sırasında yapısal olmayan proteinleri poliproteinden ayırıştırır (35).

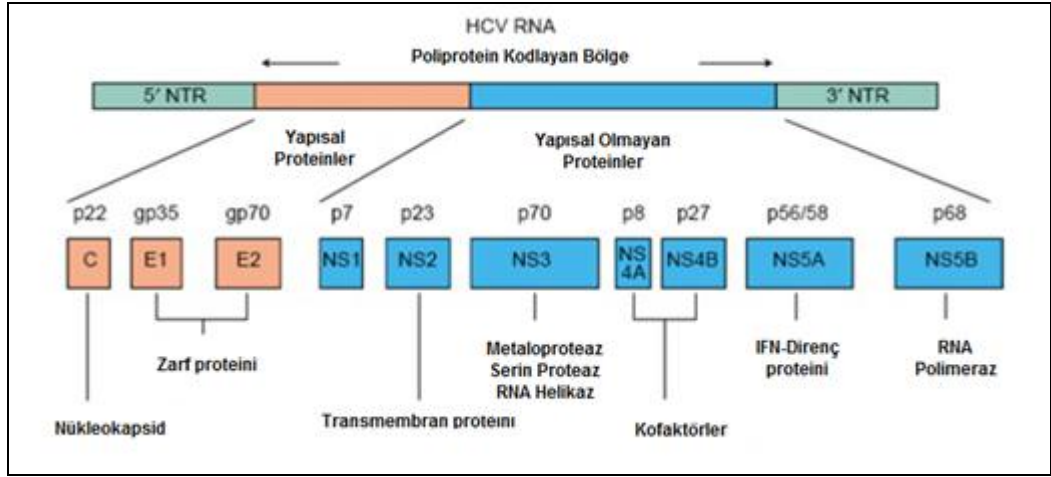
**NS4A:** NS3 proteininin kofaktörü olarak hareket eden 53 aminoasitlik bir proteindir. NS3 ve NS4A arasındaki bu etkileşim, NS3 proteininin daha etkili bir proteaz klevaj özelliği göstermesini sağlar. (51). NS4A aynı zamanda NS5A'nın fosforilasyonu için de gereklidir ve doğrudan NS5A ile etkileşime girebilir (52).

**NS4B:** Diğer viral proteinlerin alımı için önemli rol oynayan 27 kD ağırlığında küçük hidrofobik bir proteindir. NS4B, NS4A ile etkileşim halindedir. Bu nedenle, dolaylı olarak NS3 ve NS5A ile de etkileşime geçer. Bu protein ER membranında diğer yapısal olmayan proteinlerle birlikte ko-lokalize olarak bulunan, ER'yi hedefleyen bir integral membran proteini olduğu bulunmuştur. Ayrıca, membranımsı ağ oluşumunu uyarmada da görevlidir (35).

**NS5A:** İnterferon (IFN) yanıtı, hücre sinyal yolları modülasyonu ve viral replikasyonda önemli rol oynayan hidrofilik bir fosfoproteindir. IFN tedavisine yanıtındaki potansiyel rolü nedeniyle ilgi çeken bir proteindir. Bu proteini kodlayan gen, IFN tedavisine direnç kazandıran bir bölge içermektedir (53).

**NS5B:** 65 kD ağırlığında RNA-bağımlı RNA polimeraz etkinliğindeki bir proteindir. NS5B proteini bu etkinliğiyle replikasyonda pozitif polariteli RNA'lardan negatif polariteli RNA'ların oluşumunu ve tekrar negatif polariteli RNA'dan pozitif

polariteli RNA'ların oluşumunu sağlar. Bu önemli rolü nedeniyle antiviral ajanlar için seçilen bir hedeftir (54).



Şekil 2.3. HCV genomu tarafından kodlanan proteinler (55)

Çizelge 2.2. HCV proteinlerinin özellikleri (56)

Protein	Aminoasit pozisyonu	Proteinin moleküler kütlesi	Virionun yapısında bulunma	Antijen	İşlev
Kor	1-199	p21	Evet	c22	Nükleokapsid
E1	192-383	gp37	Evet	-	Membran Glikoproteini
E2	384-746	gp61	Evet	-	Membran Glikoproteini
p7	747-809	p7	Evet?	-	İyon kanalları

**Çizelge 2.2.** HCV proteinlerinin özellikleri (56) (devam)

Protein	Aminoasit pozisyonu	Proteinin moleküler kütlesi	Virionun yapısında bulunma	Antijen	İşlev
NS-2	810-1026	p23	Evet?	-	Metalloproteaz Transmembran Proteini
NS-3	1027-1657	p68	Hayır	c33c	Serin Proteaz Helikaz NTPaz
NS4A	1658-1711	p6	Hayır	c100-3	Serin Proteaz Kofaktörü
NS4B	1712-1972	p26	Hayır	-	“Membranımsı ağ” Oluşumu
NS5A	1973-2420	p56	Hayır	NS5	Fosfoprotein
NS5B	2421-3011	p65	Hayır	NS5	RNA Bağımlı RNA Polimeraz

#### 2.1.2.4. Yaşam Döngüsü ve Replikasyon

HCV'nin *in vitro* insan ve şempanze karaciğer primer hücre kültürlerinde, T-lenfoma ve B-lenfoma hücre dizinlerinde, periferik kan mononükleer hücrelerde çoğaltılabildiği tespit edilmiştir (57). Ancak virusun çoğalma düzeyleri bu hücrelerde yavaştır ve düşük seviyedeki HCV RNA sentezi yalnızca yüksek hassasiyetteki reverz transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (Reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR) tarafından görüntülenebilmektedir. Bu nedenle HCV replikasyonuna ilişkin aşamalar henüz ayrıntılı olarak tanımlanmamıştır (58).

Virusun yaşam döngüsü şimdiye kadar şempanzeler üzerinde yapılan çalışmalardan ve diğer flavivirusların kullandıkları mekanizmalardan elde edilen bilgiler ışığında anlaşılmaya çalışılmıştır (2). HCV'nin *in vitro* replikasyonu ile ilgili bugün gelinen en son aşama replikonlardır. Bunun öncü sistemleri ise cDNA/*in vitro* transkriptlerdir. Bunun avantajı, infeksiyonu oluşturan başlangıç materyalinin oldukça

bol miktarda ve homojen olarak elde edilmesidir (42). Replikon sistemleri ile Huh-7 (Human hepatoma line-7) hücre dizinlerinde, HCV replikasyonları başarıyla gerçekleştirilmiştir (59).

Eldeki bilgiler ışığında replikasyon aşamaları şöyledir (2);

### **1.Virusun Konak Hücreye Bağlanması ve Ribozoma Transportu**

HCV'nin hücreye girişi, bir infeksiyonun başlangıcı için gerekli olan hedef hücre ve virus arasındaki etkileşimin ilk aşamasıdır. Son çalışmalar HCV'nin hücreye girişinin yavaş, karmaşık ve aşamalı bir süreç olduğunu göstermektedir (55). Virusun hücreye reseptörler aracılığıyla endositozla girdiği düşünülmektedir. Glikozaminoglikanlar (GAGs), CD81, toplayıcı reseptör sınıf B tip I (SRBI), Claudin aile üyeleri (CLDN1, 6 ve 9), mannoz-bağlayıcı lektin (MBL), DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) ve L-SIGN (Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin) dahil olmak üzere konak hücre yüzeyindeki birçok molekülün olası HCV reseptörü veya ko-reseptörü olabileceği tespit edilmiştir (2, 60).

GAGs ve LDL-R (Low Density Lipoprotein Receptor), konak hücreye bağlanmayı kolaylaştırırlar. Bu etkileşime muhtemelen HCV virionlar ile ilişkili lipoproteinler aracılık etmektedir. Başlangıçtaki bu bağlanma adımından sonra olasılıkla CD81 ve SRB1 parçacıkları arasında etkileşim olmaktadır. HCV hücreye girişin ileri aşamalarında işlev gören E2 proteini CD81 ve CLDN1 reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanır. Bu reseptörler virusun hücreye girmesinde önemli rol oynamaktadır (61). HCV birçok insan hücre dizisinde ekspresse olmasına rağmen virusun hücreye girebilmesi için bilinen faktörlerin dışında buna aracılık eden bazı ek hücrel faktörlere gereksinim duyduğu anlaşılmaktadır. Son yıllarda konak hücreyi viral infeksiyonlardan korumak için EW1-2wint gibi birçok konak restriksiyon faktör tespit edilmiştir (62, 63). EW1-2wint HCV glikoprotein ve CD81 arasındaki etkileşimi bloke ederek hedef hücrelere HCV girişini engelleme yeteneğinde olan bir CD81 ilişkili proteindir (63).

## **2. HCV RNA Translasyonu ve Post-translasyonel Modifikasyonları**

Virus hücre içine girdikten sonra viral kapsidini kaybeder ve serbest kalan genom ilk olarak IRES bölgesi aracılığıyla 40S ribozomal alt birime bağlanarak HCV proteinleri üretilir (64). Proteinler üretildikten sonra konformasyonel değişikliğe uğrar ve ökaryotik inisiasyon faktör 3 ile kompleks oluşturur. Böylece poliprotein translasyonu başlar (65). Viral proteazlar tarafından poliproteinler kesime uğrar. Bu kesimin ilk aşaması ER'de gerçekleşir ve ilk olarak poliproteinin 5' ucundaki yapısal proteinler kesilir. Bu aşamadan sonra poliprotein NS2/NS3 sınırından kesilir. Geri kalan post-translasyonel süreç NS4B/NS5A, NS4A/NS4B, NS3/NS4A ve NS5A/NS5B proteinlerinin kesimi ile tamamlanır (66).

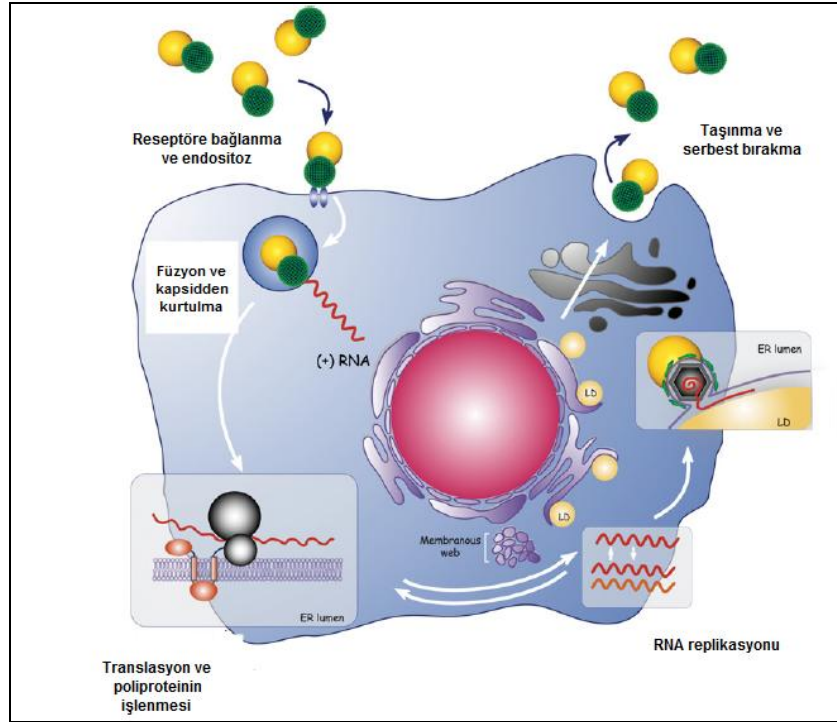
## **3.HCV RNA Transkripsiyonu (Replikasyonu)**

Hücre içinde aktif replikasyon bölgelerinde membranöz vezikül (replikaz kompleksi) oluşumu vardır. Bu yapının viral (örn. NS5A) ve konak hücre faktörleriyle uyumlu olarak muhtemelen NS4B tarafından indüklendiği düşünülmektedir (67). Replikasyon sonrasında NS5B proteini ve pozitif polariteli RNA'nın 3' ile birlikte replikaz kompleksine bağlanır. Bu kompleks yardımıyla RNA- bağımlı RNA polimeraz aktivitesi sonrasında pozitif polariteli RNA'dan negatif polariteli RNA ara molekülü sentezlenmesi replikasyonu başlatır. Yeni oluşturulan negatif polariteli RNA daha sonra pozitif polariteli RNA'nın aşırı üretilmesi için şablon görevi yapar (54). Bu RNA'lar ya RNA çoğaltmada yeni bir tur için kullanılır ya da virus parçacıkları halinde paketlenir. NS5B'nin RNA-bağımlı RNA polimeraz aktivitesiyle yavru pozitif polariteli RNA transkripsiyonu ile replikasyon tamamlanır (2).

## **4. Virusun Paketlenmesi ve Salınımı**

Genom paketlenmesi sürecinin ER'de gerçekleştiği varsayılır, nükleokapsitler zarf yapısı kazanır ve golgi aygıtında olgunlaşır. Yeni üretilen virionlar ekzositozla periselüler boşluğa alınır (68). Bu süreçteki bir aşamasında virus hedef hücreleri infekte

etmeye hazır hale gelir. Ancak virusun olgunlaşması ve serbest bırakılması süreçlerine ait detaylı moleküler bilgi henüz yoktur (Şekil 2.4) (69).



Şekil 2.4. HCV'nin Yaşam Döngüsü (70)

### 2.1.2.5. HCV Genotipleri

HCV genomu yüksek derecede genetik çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitlilik RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimi aktivitesinin tamir yeteneğinden yoksun olması yani, RNA polimeraz 5'-3' ekzonükleaz düzeltici okuma (proofreading) etkinliğinin yoksunluğundan kaynaklanmaktadır (5). Bir yılda her bir nükleotitdeki mutasyon sıklığı  $1,4 \times 10^3$ -  $1,9 \times 10^3$  arasında değişken bir dağılım gösterir (71).

HCV izolatları infeksiyon boyunca her replikasyonda meydana gelen mutasyonlarla farklılaştığından dolayı heterojen yapılıdır. Bu yüzden nükleotid düzeyde birbirine çok yakın virus topluluklarından meydana gelen bir viral havuz oluşmaktadır. Bu virus topluluğuna da Quasispecies (Türümsü) denilmektedir (6).

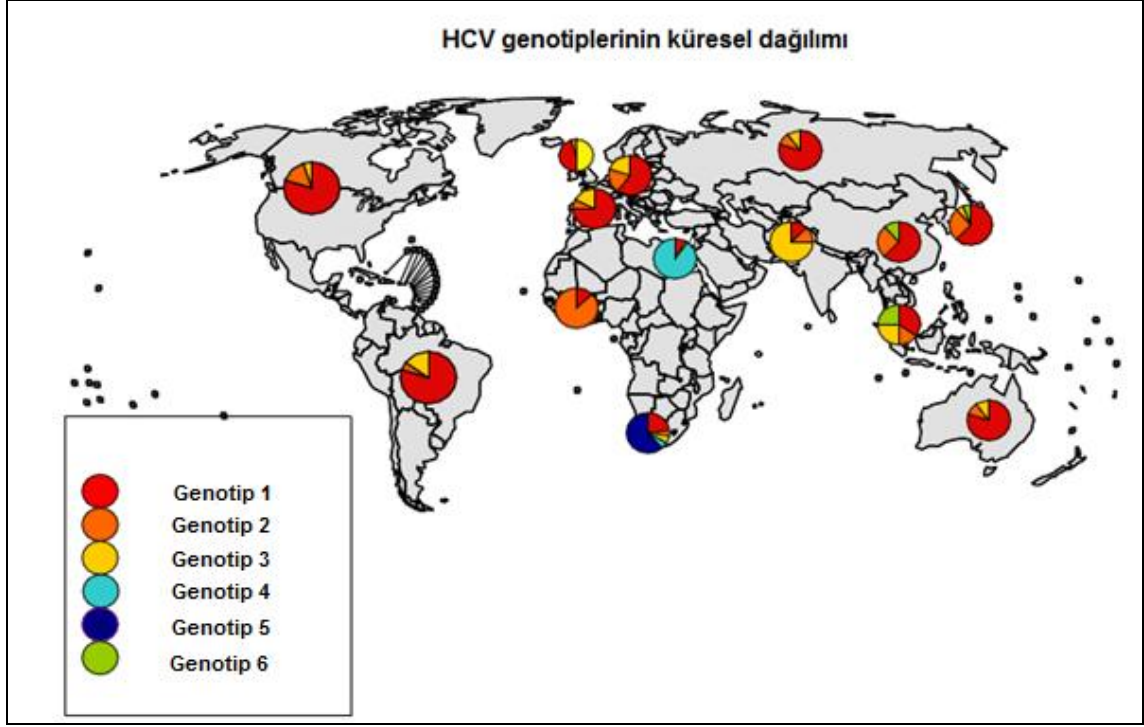
HCV'nin genetik çeşitliliği genomu boyunca farklılıklar gösterir. Değişiklik tüm genom boyunca devam etse de genomun 5'UTR bölgesi iyi korunmuş olup genotipler arasındaki benzerlik %90'dan fazladır (72). 5'UTR bölgesi HCV izolatları arasında %81-88 oranında sekans benzerliği göstermektedir. Genomun en değişken bölgesi zarf proteinlerini kodlayan E1 ve E2 bölgesidir. Farklı hastalardan izole edilen suşlarda E2 proteininin HVR1 ve HVR2 bölge dizilerinde %50'den fazla oranda varyasyon bulunmuştur. Bu nedenle HVR tarafından kodlanan polipeptidler sıklıkla aminoasit değişikliklerine uğrarlar (73).

HCV genotiplerinin sınıflandırılmasında nükleotid dizi benzerliğini temel alan Simmonds modeli kullanılmaktadır. Bu modele göre genotipler rakamlarla (1, 2, 3...), subtipler ise küçük harflerle (a, b, c, d...) gösterilmektedir (75). Şu andaki bilgilere göre %35'lere varan sekans farklılığı gösteren 6 ana genotip (1 ile 6 arası) ve sekans farklılığı %20'lere varan 50'den fazla subgenotip tanımlanmıştır (6).

HCV genotiplerinin küresel dağılım çalışmaları ve filogenetik ilişki analizleri ile çeşitleri ve ortaya çıkışları hakkında bilgi sağlamıştır. Genotip 2'nin dünya çapındaki dağılımı 90-150 yıl önce; subtip 1b'nin 60-70 yıl önce ve genotip 3'ün ki yaklaşık 40 yıl önce başlamıştır. Genotip 4'ün, 350 yıl ve genotip 6'nın, 700 yıl önce olmak üzere diğer genotiplerden çok daha önce ortaya çıktığı sanılmaktadır (76).

HCV genotipleri coğrafi olarak değişkenlik göstermekle birlikte bazı genotipleri tüm dünyada yayılmışken bazıları ise belirli coğrafi bölgelerle sınırlıdır. Örneğin Batı Afrika'da, genotip 2 ve birçok subtipi, Orta Afrika'da, genotip 4 (4b, 4c, 4e ve 4m), Güney Afrika'da ise genotip 5 baskındır. Buna karşılık Avrupa'nın subtip sayıları daha sınırlıdır. Bu bölgelerde ve tüm dünya üzerinde daha çok genotip 1, 2 ve 3 yaygındır. Tip 1a Amerika'da, 1b ise Japonya'da ana genotipi oluşturmaktadır. Tip 6, Hong Kong ve Güneydoğu Asya bölgelerinin baskın genotipleridir (Şekil 2.5) (77). Ülkemizde Altuğlu ve ark. tarafından yapılan çalışmaya göre baskın genotip 1 (%97,1), baskın subtip ise 1b (% 87,2) olarak bulunmuştur. Daha az oranlarda subtip 1a (%9,9), genotip 3 (%1,4), genotip 2 (%0,9) ve genotip 4 (%0,6) belirlenmiştir. Genotip 5 ve 6 ise yapılan çalışmada bulunamamıştır (78).





Şekil 2.5. HCV genotiplerinin küresel dağılımı (7)

### 2.1.3. Patogenez

HCV geniş klinik spektrumlu ve kronikleşme eğilimli bir enfeksiyondur. HCV'nin neden olduğu karaciğer hastalığının şiddeti normal karaciğer parametrelerine sahip asemptomatik kronik enfeksiyondan, hızlı bir şekilde siroz ve hepatosellüler karsinomaya (HSK) yönelebilen şiddetli kronik hepatite kadar geniş bir klinik dağılım gösterir (10).

HCV enfeksiyonu sırasında oluşan humoral ya da hücreli bağışıklıktan hangisinin HCV patogenezinde daha çok rol oynadığı henüz kesinlik kazanmamıştır ancak HCV gibi nonsitopatik virüslere karşı konak savunmasında adaptif hücreli immün yanıtın önemli olduğu düşünülmektedir (79).

HCV enfeksiyonunun varlığı periferik kandaki mononükleer hücreler, monositler ve lenfositlerin varlığı ile gösterilmektedir. HCV antijenlerine karşı gelişen ilk antikor yanıtları genellikle kor ve NS3 proteinlerine karşı gelişirken daha sonra NS4 ve E1, E2 proteinlerine karşı gelişir. HCV enfeksiyonunda kor bölgesine karşı gelişen antikorlar

immünoglobulin G1 ve G3 (IgG1 ve IgG3) izotiplerini kapsarken, diğer HCV proteinlerine karşı gelişen özgül antikorlar IgG1 izotipleriyle sınırlıdır (80).

Hücrel immün yanıtın kalitesi HCV enfeksiyonunun kronikleşmesi ya da yok edilmesi açısından önemlidir. Virusa özgü CD4+T ve CD8+T hücreleri viral kontrolden ve karaciğer hasarından sorumludur (35).

İnflamatuvar ve düzenleyici faaliyetleri ile CD4+T ve salıverdiği sitokinler kronik HCV enfeksiyonu immünopatogenezinde önemli rol oynamaktadır. CD4+T hücre yanıtı tip 1 ve tip 2 yardımcı T hücreleriyle (T helper cells: Th1 ve Th2) immün yanıtta rol alır. Th 1 hücreleri, doğal öldürücü (Natural Killer: NK) hücre aktivasyonu ve sitotoksik T lenfosit (CTL) oluşumunu içeren konak antiviral immün yanıtın gelişmesi için önemli uyarıcı olan interlökin 2 (IL-2) ve interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) salgılar. Th2 hücreleri ise Th1 yanıtını azaltır ve antikor üretimini arttıran IL-4 ve IL-10 salıverir. Virusun temizlenerek akut hepatitin sınırlandırıldığı akut HCV enfeksiyonlu hastalar güçlü bir Th1 yanıtı geliştirirken, Th2 yanıtını daha zayıf ya da hiç geliştirmezler. Bunun aksine kronik enfeksiyon geliştiren hastalar baskın bir Th2 yanıtı gösterirken Th1 yanıtını zayıf gösterirler. Bu gözlemler, Th1 sitokinlerinin etkisinin HCV enfeksiyonuna karşı koruma için çok önemli olduğunu buna karşın Th2 sitokinlerinin hastanın immün sistemi üzerine baskılayıcı bir etkiye sahip olduğunu ve bu nedenle kalıcı HCV enfeksiyonu lehine iş gördüklerini düşündürmektedir (81, 82).

İnfeksiyonun kronikleşmesi ile birlikte intrahepatik CTL hücreleri baskın hale geçerek doğrudan sitopatik etkiler ve apoptotik aktiviteler ile karaciğer hasarı oluşturmaya başlar. Karaciğer hasarının oluşmaya başlamasıyla histolojik aktiviteler sonucu alanin aminotransferaz (ALT) düzeyi artar (83).

HCV enfeksiyonu sistematik bir hastalıktır ve karaciğerle ilişkili belirtiler kadar karaciğer dışı belirtiler de bu enfeksiyonun patogenezinde önemlidir. Hematopoietik hücrelerde negatif iplikli RNA'nın tespiti olası bir karaciğer dışı replikasyona işaret eder. Karaciğer dışı belirtilerinin çoğunun lenfomatik sistem üzerine HCV enfeksiyonunun etkilerinden kaynaklanmış olabileceğine ilişkin veriler bulunmaktadır ve karaciğer dışı her belirtinin farklı bir patogenez süreci sonucunda geliştiklerine ilişkin çalışmalar vardır (82, 84).

## HCV İnfeksiyonunda İmmun Yanıttan Kaçış Mekanizmaları

Kronik hepatit C infeksiyonlarında antikor ve CTL yanıtından kaçışta viral mutasyonlar büyük öneme sahiptir (85).

Kronik HCV hastalarında günde  $10^{10}$ - $10^{12}$  virion olacak şekilde hızlı bir virus çoğalması görülür ve bu virusların *in vivo* yarı ömürleri 4-7 saat kadar kısa olmaktadır. HCV genom düzeyi değişikliği RNA'ya bağımlı RNA polimerazların (NS5B) 'proofreading' aktivitesinin olmamasından dolayı çok fazladır ve bundan dolayı 'türümsümler' meydana gelmektedir. Türümsümler adı verilen heterojenik HCV popülasyonu genetik olarak birbirinden %1-9 bazlık farklılıklar gösterir (85, 86).

Oluşan türümsümler immün yanıtın selektif baskısıyla popülasyona hakim olmakta ve değişken hücre tropizmi, humoral ve hücrel immüniteden kaçış, geliştirilen aşılardan etkisiz kalması ve hızlı bir ilaç direnci oluşmasına neden olmaktadır (87).

### 2.1.4. Klinik Belirti ve Bulgular

#### 2.1.4.1. Akut Hepatit C

Hepatit C, hastalığın geç evrelerine kadar subklinik seyrettiği için akut dönemde Hepatit C'nin tanınması oldukça güçtür. Akut Hepatit C (AHC) infeksiyonunun ortalama inkübasyon süresi 6-8 haftadır ancak bu süre kan ve kan ürünleriyle bulaşta kısalmaktadır. Temastan 7-21 gün sonra serumda HCV RNA saptanabilmektedir. İnfeksiyonun ilk 8-12 haftasında viremi en üst seviyeye ulaşır. Serumda anti-HCV antikorları virus alındıktan 20-150 gün sonra pozitifleşir ve ALT yükselmesi ise genellikle 4. haftadan sonra olur (88, 89).

AHC'de klinik bulgular genellikle hafif seyreder. Hastalarda halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık, kas ağrısı, sağ üst kadranda ağrısı, bulantı, kusma ve idrar renginde koyulaşma gibi semptomlar görülebilir. Olguların %20'sinden daha azında ise sarılık görülmektedir (13).

AHC'de serum ALT ve bilirubin düzeyleri dalgalanma gösterse de çoğu hastada normalleşir fakat bu normalleşme hastanın virustan temizlendiğini göstermez. Hastaların yaklaşık %15-20'si tam olarak iyileşirken, geri kalanında hastalık kronikleşir (11).

#### **2.1.4.2. Kronik Hepatit C**

HCV ile infekte kişilerin %80-85'inde Hepatit C infeksiyonu kronikleşmektedir. Kronikleşen olgularda hastalık, asemptomatik seyrettiği için sirozun geç evrelerine ve hatta HSK gelişinceye kadar sessiz kalabilmektedir. Kronik Hepatit C'de (KHC) en sık bildirilen semptom yorgunluktur. Ayrıca iştahsızlık, halsizlik, kaşıntı, kilo kaybı, bulantı ve eklem ağrısı gibi semptomlar da bildirilmiştir (88, 90).

KHC'de serum ALT düzeyi açısından hastalar farklılık gösterir. Bazen HCV RNA pozitif olmasına karşın serum ALT düzeyi normal sınırlar içindedir bazen de serum ALT düzeyi yüksektir fakat serum ALT düzeyi genellikle normalin 3 katını geçmez. Bilirubin serumda normal sınırlardadır ancak siroz geliştiğinde düzeyinde yükselme gözlenir. ALT seviyeleri ise hastaların yaklaşık 1/3'de normal ya da normale yakındır (11).

KHC olgularının büyük çoğunluğunda olay bu evrede kalmakta ve siroz gelişmemekte ancak %20-30 olguda hepatik fibrozis, bunun sonucunda siroz ve HSK gelişmektedir (12). Sirotik evredeki Hepatit C'li hasta HSK insidansı %3 civarındadır. Bununla birlikte bunlar uzun süreli komplikasyonlardır ve infeksiyonun başlangıcından 20 yıl sonra ya da daha uzun sürede ortaya çıkarlar. Ancak bazı özellikler fibrozisin seyrini olumsuz etkilemekte ve siroza gidişini hızlandırmaktadır. Fibrozisin ilerleme riski, virusa 40 yaşından sonra maruz kalanlarda, erkek hastalarda ve alkol kullananlarda daha yüksektir (13)

## 2.1.5. Epidemiyoloji

### 2.1.5.1. Bulaşma Yolları

HCV bulaşması ya büyük miktarda ya da tekrarlayan perkütan temaslar sonucunda gerçekleşir. Yalnızca bir kez temasla (kan veya diğer vücut sıvılarına mukoza temas) HCV daha az oranda bulaşır (91).

İnfeksiyöz virus için çevrenin rezervuar olabileceğine dair kanıtlar vardır. Bu konuyla ilgili yapılan incelemelerde çevresel kaynaklardan bulaşmayı desteklemektedir. Deneysel bir çalışmada, kuruyup oda ısısında bir süre bekleyen kanda HCV infektivitesinin devam ettiği gösterilmiştir (92).

Yapılan çalışmalarda belirlenen HCV ile ilişkili başlıca risk faktörleri şunlardır: İnfekte donörden solid organ transfüzyonu, intravenöz (İV) uyuşturucu kullanımı, iğne batması gibi temaslar, kan ve kan ürünleri transfüzyonu, infekte anneden bebeğine bulaş, infekte partnerle cinsel ilişki. Bu risk faktörleri arasında en önemlileri kan ve kan ürünleri transfüzyonu, İV uyuşturucu kullanımı ve güvenli olmayan terapötik injeksiyondur (Çizelge 2.3) (93, 9).

**Çizelge 2.3.** HCV bulaş yolları ve düzeyleri (9)

HCV bulaş yolları	HCV Bulaş Düzeyleri		
	Düşük	Orta	Yüksek
İV uyuşturucu kullanımı	++++	++	+
Transfüzyon	+++	+++	+++
Güvenli olmayan terapötik injeksiyon	+	++++	++++
Mesleki bulaş	+	+	+
Perinatal Bulaş	+	+	+
Korunmasız cinsel ilişki	++	+	+/-

Anti-HCV taramaları yapılmadan önce transfüzyona bağılı HCV infeksiyonu tüm dünyada önemli bir sorun teşkil ediyordu. Ancak bu sorun günümüzde kan bankalarında HCV testini rutin tarama testlerine koyan ülkelerde, bu testi kan bankalarında rutine koymayan ülkelere oranla neredeyse ortadan kalkacak kadar azalmıştır (2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre gelişmekte olan ülkelerin kan bankalarındaki kanların %43'ü HCV ve diğeri kan yoluyla bulaşan hastalıklar açısından uygun şekilde test edilmemektedir (94). Ülkemizde ise 1996'dan beri anti-HCV testi tüm kan bankalarında zorunlu hale getirilmiştir (95).

HCV infeksiyonundaki bir diğeri önemli risk faktörü, güvenli olmayan terapötik enjeksiyonlardır. Dünyada kontamine enjeksiyona bağılı yılda yaklaşık 2 milyon yeni HCV infeksiyonunun geliştiğı ve bunun bütün HCV infeksiyonlarının yaklaşık %40'ını kapsadığı hesaplanmıştır. Güvenli olmayan enjeksiyonla HCV bulaşına steril tek kullanımlık enjektörlerin yetersizliğı, hastane ve diğeri tedavi ünitelerinde kullanılan ekipmanların yetersiz dezenfeksiyonu ve İV uyuşturucu kullanımı örnek verilebilir. Özellikle İV uyuşturucu kullanımı, A.B.D.'nde son 40 yıldır en başta gelen bulaşma yoludur. HCV seroprevalansının 5 yıl ve daha kısa süreli İV uyuşturucu kullananlarda %20-46 arasında olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (93). Bizim ülkemizde yapılan çalışmalarda bu yolla HCV geçişi çok nadir olup KHC'li hastalarda İV uyuşturucu kullanım oranı %3.1 olarak bulunmuştur (95).

HCV'nin perinatal geçişi nadir olmakla birlikte oranı %4-7 arasındadır. Bulaş, anne kanında HCV RNA pozitifse doğum sırasında gerçekleşir. Ancak sezeryan, vaginal doğum veya anne sütü almanın HCV infeksiyonu ile bağlantısı olup olmadığı hala tartışma konusudur (96). Diğeri bir tartışmalı konu ise HCV'nin seksüel aktivitelerle ne derece bulaşabildiğidir. Yapılan son çalışmalar cinsel temasın HCV bulaşında etkinliğinin düşük olduğunu göstermektedir. Cinsel yolla bulaş özellikle birden fazla cinsel partneri olanlarda, homoseksüellerde ve insan bağışık yetmezlik virusu (Human Immunodeficiency Virus: HIV) ile birlikte ko-infeksiyonu olanlarda tek eşli heteroseksüellere oranla çok daha fazla olmaktadır (97).

HCV bulaşı yukarıda bahsedilen bu nedenler dışında birçok yolla bulaşabilir. Bunlar arasında; sünnnet, akupunktur, kozmetik işlemler, piercing, dövme, intranazal uyuşturucu kullanımı sayılabilir. Yapılan çeşitli çalışmalarda bu faktörlerin az ya da çok oranda HCV riskini ve yaygınlığını arttırdığı tespit edilmiştir (8).

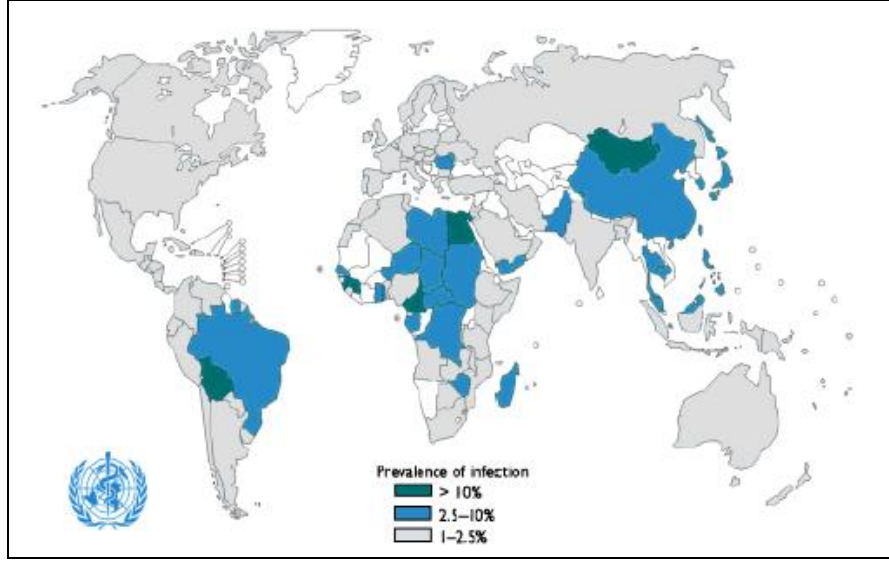
### 2.1.5.2. Dünyada HCV İnfeksiyonu

HCV infeksiyonu tüm dünyada yaygın olmakla birlikte infeksiyonun dağılımı coğrafi bölgelere ve aynı bölgeler içindeki demografik özelliklere göre farklılık göstermektedir. Tüm dünyada sirozun %27'si, HSK'nın ise %25'i HCV ile ilişkilidir (9, 98).

DSÖ verilerine göre dünyada HCV prevalansı yaklaşık %2.2-3 arasında olduğu ve her yıl ortalama 3- 4 milyon kişinin HCV ile infekte olduğu tahmin edilmektedir. Bu oranlarda dünyada 130 ila 170 milyon kişinin HCV pozitif olduğunu gösterir. 35 milyondan fazla kişi her yıl HCV ile ilişkili karaciğer hastalıklarından ölmektedir (7).

HCV prevalansının en düşük olduğu İngiltere ve İskandinavya ülkelerinde oran %0.01-0.1'dir. En yüksek prevalans ise yaklaşık %15-20 oranla Mısır'dan bildirilmiştir. Asya ve Afrika'da prevalansın yüksek olduğu yerler arasındadır. Fransa ve Avustralya'nın prevalansı %1.1 olarak bildirilmişken bu oran A.B.D.'nde %0.8, Japonya'da %1.5-2.3 ve İtalya'da %2.2 olarak bildirilmiştir. Prevalansın daha düşük olduğu Almanya'da oran %0.6, Kanada'da ise %0.8 olarak bildirilmiştir. Türkiye dünya haritasında prevalansı %1-1.9 arasında olan ülkeler içinde yer almaktadır (Şekil 2.6) (8, 98).

Akut HCV infeksiyonunun genellikle asemptomatik seyretmesi, akut infeksiyonun kronik infeksiyondan ayıran testlerin henüz olmaması HCV infeksiyonu insidansının belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Bir çok ülkenin akut hastalık vakalarını sistematik olarak toplamaması ve sürveyans sistemi gelişmiş olan ülkelerde akut vaka bildirim sistemi HCV insidansını gerçekte olduğundan düşük göstermesi nedeniyle insidans değişimini anlamak için çoğu zaman yaşa spesifik prevalans verileri dikkate alınmaktadır (99).



Şekil 2.6. Ülkelerin HCV dağılım haritası-DSÖ, 2007 (8)

HCV infeksiyonunun yaşa özgül prevalansına ilişkin çalışmalar incelendiğinde; A.B.D.'nde en yüksek prevalans 30-49 yaşlar arasında iken 20 yaşın altında ve 50 yaşın üstündeki gruplarda prevalans ortalamasının altındadır. Bu da HCV bulaşının göreceli olarak 10-30 yıl önce gerçekleştiğinin işareti olarak değerlendirilir. Avustralya'da da A.B.D.'ndekine benzer bir tablo vardır. İtalya, Japonya, İspanya ve Çin gibi ülkelerde ise yaş ilerledikçe yaşa özgü prevalans artmaktadır. Bu da HCV bulaşının yaklaşık 30-50 yıl önce gerçekleştiğini göstermektedir. HCV prevalansının en yüksek görüldüğü Mısır'da ise prevalans yaşla birlikte düzenli olarak artar. Bu da uzak geçmişte artan HCV bulaşma riskini, süregiden yüksek riskin izlendiğinin bir göstergesidir (2, 9).

### 2.1.5.3. Türkiye'de HCV İnfeksiyonu

Hepatit C'nin Türkiye'de yaygınlığı Hepatit B'ye göre daha azdır ancak son yıllarda kronik hepatitlerin etyolojisinde HCV'nin rolü giderek artmaktadır. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda son yılda HCV'nin siroz etyolojisine katkısı %25.2 iken %45.9'a yükselmiştir. Bu oranların belirlenmesinde HCV tanı testlerinin geliştirilmesinin önemi büyüktür (100).



HCV'nin ülkemizdeki yaygınlığı kan donör çalışmaları ile saptanmış ve anti-HCV pozitiflik oranı %0.54 olarak tespit edilmiştir. Bu oranda yıllar içinde çok büyük değişiklik saptanmamıştır. Ancak hemodiyaliz olgularında bu oran %20-30 olarak değişiklik göstermektedir (101).

Yapılan çalışmalarda ülkemizde farklı illerdeki anti-HCV pozitifliği farklı oranlarda bildirilmiştir. Afyon, Düzce, Manisa, Samsun ve Erzurum anti-HCV pozitiflik oranı %1'in üzerinde olan illerdir (102). Diğer illerdeki anti-HCV pozitiflik oranının yıllara göre dağılımı tabloda verilmiştir (Çizelge 2.4) (103).

**Çizelge 2.4.** Ülkemizdeki kan donörlerinde anti-HCV prevalansı (103)

<b>İl</b>	<b>Yıllar</b>	<b>Anti-HCV(%)</b>
Aydın	1993-2000	0.16
Trabzon	1997-2000	0.74
Mersin	1999-2000	0.26
Van	1998-2001	0.22
İzmir	2002-2006	0.54
Diyarbakır	2004-2006	0.55
Denizli	2007-2008	0.5
İstanbul	1998-2008	0.04
Ankara	2008-2009	0.6
Kastamonu	2010	0.36

Ülkemizde özellikle 50 yaşından sonra yaşa özgü prevalansın arttığını gösteren çalışmalar vardır. Bu da bize İtalya, Japonya gibi ülkelerdeki yaş prevalansına uyumlu olarak HCV enfeksiyonunun büyük kısmının 30-50 yıl önce kazanıldığını düşündürebilir. Ayrıca kronik hepatit, siroz ve HSK'nın da en çok bu yaş grubunda görüldüğü bildirilmiştir. Ülkemizde kronik enfeksiyon oranı erkeklerde kadınlara oranla daha fazla olup dünyadaki oranlarla uyumludur (104).

#### **2.1.5.4. Hepatit C Virusu İlişkili Hepatosellüler Karsinoma (HSK) Epidemiyolojisi**

HSK günümüzde önemli ve yaygın bir kanser türüdür. Dünyada HSK yeni vakalarının yıllık sayısının bir milyondan fazla olduğu tahmin edilmektedir. Dünya çapında en yaygın görülen beşinci sıradaki kanser türü olup kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır (105).

HSK'nın küresel dağılımı hastalığı etkileyen faktörlerden dolayı farklılık göstermektedir. HSK insidansı Kuzey ve Doğu Avrupa, Güney, Orta, Batı Asya gibi ülkelerde düşük iken; Doğu ve Güneydoğu Asya, Orta ve Batı Afrika'da yüksektir (106).

Bayanlarda HSK oluşumu erkeklere göre daha azdır. Bu durum neredeyse tüm ülkelerde gözlenmiştir. Bu nedenle İsveç gibi bazı Avrupa ülkelerinde cinsiyet temelinde sırasıyla erkek/kadın insidans oranı 4:1, İtalya'da ve Fransa'da bu oran 5:1'dir. Gelişmekte olan ülkelerde ise örneğin Çin'de aynı oran 3:1, Gambiya'da 2.8:1, Zimbabve'de ise 2.4:1'dir. Bu durumun nedeni iyi bilinmemekte ancak durumu etkileyen çeşitli faktörlerin olduğu bilinmemektedir. Erkeklerin vücut kitle indeksinin daha yüksek, alkol ve sigara tüketiminin daha fazla olması ayrıca erkeklerdeki cinsiyet hormonu olan testosteronun HSK gelişiminde muhtemel rol oynayabileceği gösterilmiştir (107).

HSK'ya neden olan birçok önemli faktör vardır. Bunlar arasında en önemlilerinden biri HCV enfeksiyonudur. HCV enfeksiyonu kronikleşerek fibroza ilerleyen aşamalarda ise siroz ve HSK'ya neden olmaktadır. HCV ile ilişkili HSK insidansı gelişmekte olan ülkelerde %33, gelişmiş ülkelerde ise %20'dir (106).

HCV enfeksiyonunun, insidansın oldukça düşük olduğu Avrupa ve A.B.D.'nde HSK'nın önde gelen nedeni olduğu bildirilmiştir. Günümüzde A.B.D.'nde KHC ile enfekte yaklaşık üç milyon hasta olduğu ve bu hastaların yılda %0.5-5 oranında HSK geliştirdiği tahmin edilmektedir (108).

Afrika ve Mısır'da, HSK'nın en önde gelen artış nedeni HCV enfeksiyonudur. Mısır, dünyada HCV oranı en yüksek ülke olarak bilinmektedir. Mısır'da insanların yaklaşık %24'ü HCV taşıyıcısı ve %50'den fazla kan donörünün anti-HCV'ye sahip olduğu tahmin edilmektedir (107).

HCV infeksiyonuna karşı henüz koruyucu aşı geliştirilememesi ve uyuşturucu kullanımı, güvenli olmayan kan transfüzyonu, çok eşli cinsel yaşam gibi nedenler HCV bulaş riskini arttırmaktadır. Ayrıca HCV infeksiyonu sessiz seyreden bir hastalıktır ve infeksiyon alındıktan ortalama 30 yıl sonra siroz ve HSK gelişimine neden olmaktadır. HSK insidansı, muhtemel HCV bulaşındaki artışla ve sessiz ilerleyişine paralel olarak A.B.D. ve Orta Avrupa’da dahil dünyanın bir çok yerinde hızla artmaktadır (109).

### **2.1.6. Tedavi**

HCV infeksiyonu akut faz boyunca nadiren teşhis edilir ve bu yüzden akut hepatitin tedavisi oldukça sınırlıdır. Ancak son çalışmalar IFN ile erken tedavinin yararlı olabileceğini göstermiştir. KHC infeksiyonu olan tüm hastalar tedavi için adaydır (110). Geçmişte, standart tedavi için ya IFN tek başına kullanılır ya da IFN + ribavirin (RBV) kombinasyonu kullanılmaktaydı. IFN- $\alpha$  virusa karşı doğuştan olan immün yanıtta önemli rol oynayan bir sitokindir. INF hedef hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak işlev görür (111). Tek başına IFN- $\alpha$  tedavisinde tedaviden 12 ay sonra kalıcı yanıtın oluşma olasılığı %16-20’dir. RBV, INF tedavisiyle elde edilen kalıcı virolojik yanıtı arttıran geniş antiviral spekturumlu bir guanozin analogudur. RBV IFN sinyal yolağının düzenlenmesini etkileyerek antiviral etki gösterir. Ayrıca RBV, virion infektivite azalması ile sonuçlanan mutagenез ve RNA- bağımlı RNA polimeraz üzerine doğrudan antiviral etkiye sahiptir. RBV’i IFN ile kombine olarak kullanan hastalarda kalıcı virolojik yanıtın oluşma olasılığı %35-40 arasındadır (112).

2001 yılının başından bu yana, yeni geliştirilen IFN  $\alpha$ 2a ve INF  $\alpha$ 2b, rekombinant IFN tedavide yerini almıştır. Son zamanlarda HCV için geliştirilen standart tedavi Peg-INF- $\alpha$  + RBV kombinasyonundan oluşmaktadır. Bu kombinasyon rejimi genotip 2 ve genotip 3 ile infekte hastalarda kalıcı virolojik yanıtın oluşmasında %75-90 oranında başarılıdır. Ancak bu kombinasyon %45-52 oranında eradike edilebilen genotip 1 ve 4 ile infekte hastalarda çok daha az etkilidir (113).

Peg-INF- $\alpha$ ’nın vücuttaki yarılanma ömrü INF  $\alpha$ ’ya göre daha uzun olup, bu nedenle haftada 1 uygulanması yeterli olabilir. Günümüzde HCV tedavisinde kullanılan Peg-INF- $\alpha$ ’nın, Peg-INF-2a ve 2b olmak üzere 2 izoformu vardır. Peg-INF-2a ‘nın

vücuttaki yarı ömrü 60-80 saat arası, Peg-IFN-2b'nin ise 40 saattir. Yarı ömürleri arasındaki farka rağmen ikisi de haftada 1 uygulanır (114).

İnfeksiyonun şiddetlendiği ve monoterapiye cevap vermeyen kişilerde kombinasyon tedavi uygulanabilir. Ancak HIV ve HBV ile ko-infekte, genotip 1 ve 4 yüksek viremi titresi olan, monoterapiye cevap vermeyen, solid organ transplantasyonlu hastalarda kombinasyon tedavisiyle sonuç alınması zordur. HCV genotip 3 ile infekte, genç yaşlardaki kişilerde ve kadınlarda infeksiyonun temizlenme oranı daha yüksektir (113).

Günümüzde HCV infeksiyonunun tedavisinde, RBV ve IFN gibi klasik antiviral tedavi yöntemlerinin yanısıra, NS3/4 proteazı inhibe eden doğrudan etkili telaprevir (TVR) ve boceprevir (BOC) gibi antivirallerin kullanıldığı gösteren çalışmalar vardır (116). Ayrıca viral yaşam döngüsünde HCV RNA'nın 5' UTR bölgesine bağlanarak viral yaşam döngüsünü pozitif yönde regüle eden miRNA'lardan biri olan miR-122'nin inhibe edilmesi temeline dayalı yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir (115).

### **2.1.7. Koruma ve Kontrol**

Virusun genetik ve antijenik yapısındaki değişikliklerin çok sık olması nedeniyle HCV infeksiyonuna karşı koruyucu bir aşı henüz geliştirilememiştir. Bu yüzden HCV infeksiyonundan korunmada bulaş yollarına yönelik önlemler ön plana çıkmaktadır (56).

Bu önlemler arasında HCV ile infekte kişilerin ve yakınlarının eğitimi, kan ürünlerinin taranması, tek kullanımlık enjektörlerin kullanılması ve güvenli cinsel ilişki yer almaktadır (2).

HCV infeksiyonunun henüz çok etkin bir tedavisi yoktur ancak hastalığın erken dönemlerinde uygulanan tedavide başarı şansı yükselmektedir. Ancak HCV infeksiyonu sessiz seyrederek ve erken evrelerde nadiren teşhis edilir. Bu yüzden belli gruptaki bireylere HCV tanı testinin uygulanması gerekmektedir. Çizelge 2.5'de HCV testinin önerildiği birey grupları yer almaktadır (117).

**Çizelge 2.5.** HCV testinin önerildiği birey grupları (117)

---

Yakın veya uzak geçmişte yasadışı ilaç injekte edenler, bunlara bir kez injeksiyon yapanlar ve uyuşturucu bağımlısı olanlarda dahildir.

HCV enfeksiyonu yönünden yüksek prevalansa sahip durumu olanlar, bunlar arasında;

- HIV enfeksiyonu olanlar
- Hemofilik olup, 1987'den önce pıhtılaşma faktörü kullananlar
- Hemodiyaliz alanlar
- Açıklanamayan anormal ALT değeri olanlar

Önceden transfüzyon ya da organ transplantı alanlar, bunlar arasında;

- HCV enfeksiyonu yönünden pozitif bulunan bir donörden kan alanlar
- Temmuz 1992'de önce kan veya kan ürünü transfüzyonu alanlar
- Temmuz 1992'den önce organ transplantı alanlar

HCV enfekte anneden doğan çocuklar

HCV pozitif kanla iğne batması ya da mukozalar yoluyla temas edenler

HCV enfekte bireylerin cinsel eşleri

---

### **2.1.8. Tanı**

HCV enfeksiyonunun tanısında serolojik (dolaylı) ve nükleik asit testleri (doğrudan) kullanılmaktadır. Virusa karşı gelişen anti-HCV'yi saptayan serolojik testler sadece tanı açısından önemlidir ve tarama amacıyla kullanılır. Nükleik asit testler ise hem tanı koydurucu hem de tedaviye başlama, kesme ve yanıtın değerlendirilmesinde oldukça etkilidir (118).

### 2.1.8.1. Serolojik Tanı Yöntemleri

Kullanım kolaylığı, pahalı olmaması, otomatize olması ve yinelenebilirliği nedeniyle HCV enfeksiyonunun serolojik tanısında en sık kullanılan yöntem EIA (*Enzyme Immuno Assay*)'dır. Bu güne kadar üç nesil EIA testi kullanılmıştır. 1990 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (*Food and Drug Administration: FDA*) tarafından onaylanan birinci nesil EIA testi NS3 proteininin c100-3 epitopuna karşı antikorları saptayabiliyordu. Bu testin kan bankalarında tarama testi olarak kullanılmaya başlaması ile transfüzyona bağlı hepatitlerin sayısında önemli düşüş sağlamışlardır. Ancak bu test düşük duyarlılığa ve düşük özgüllüğe sahiptir. 1992 yılında kullanıma giren ikinci nesil EIA testine kor (c22-3) ve NS3 proteini (c33c) bölgelerinden yeni antijenlerin eklenmesi ile duyarlılık ve özgüllük artmıştır. Üçüncü nesil EIA testleri ise NS5 proteininden bir rekombinant proteinin eklenmesinin yanı sıra yeniden yapılandırılmış kor ve NS3 proteini antijenleri eklenerek 1996'da lisans almıştır. Bu testin duyarlılığı ve özgüllüğü son derece yüksek olmasına karşın anti- HCV'nin saptanabilmesi için enfeksiyonun kazanımından sonra 4-10 (ortalama 8) haftalık bir sürenin geçmesini gerektirmektedir. Ayrıca, immünsüprese ve hemodiyaliz hastalarında yalancı negatif sonuçlar çıkma olasılığı ile otoimmün hastalık ve spontan iyileşme görülen olgularda yanlış pozitiflik çıkma olasılığının yüksek olması nedeniyle bu test, bu gibi özel gruplarda doğrulanmalıdır. Bu yüzden HCV enfeksiyonu belirlemede kısıtlı bir kullanıma sahiptir. (119, 120, 121).

RIBA, bu amaçla geliştirilmiş bir doğrulama testi olup HCV genomunun farklı bölgelerinden köken alan rekombinant HCV antijenleri kullanılarak ve bu proteinlerin her birine ayrı ayrı antikor yanıtlarının saptanabildiği bir testtir. Testin doğrulanması için antijenlerden en az iki tanesine karşı pozitiflik geliştirilmesi yeterlidir. Tek bir antijene karşı pozitiflik elde edilmesi ise 'indetermine' yani belirsizlik anlamına gelmektedir. RIBA testlerinin EIA'ya göre duyarlılıkları daha düşüktür ancak spesifiteleri daha yüksektir (120).

### 2.1.8.2. Nükleik Asit Testleri

Nükleik asit testleri serolojik testlerden oldukça farklıdır. Nükleik asit testleri serum/plazma HCV RNA'nın saptanması ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemle 1-3 hafta içinde serumda HCV RNA saptanabilir, bu süre antikorların saptanmasından haftalarca öncedir.

Nükleik asit testlerinin özellikle şu durumlarda kullanılması önerilmektedir;

- Serolojik olarak pozitif,
- Serolojik olarak negatif ancak açıklanamayan bir karaciğer hastalığı olan,
- Serolojik olarak negatif ve immün sistemi baskılanmış olan,
- Akut HCV enfeksiyonundan kuşku edilen bireylerde.

Serumdaki HCV RNA'yı saptayabilmek için hem kalitatif hem de kantitatif testler geliştirilmiştir (118).

#### 2.1.8.2.1. Kalitatif testler

HCV RNA'nın kalitatif olarak tayininde RT-PCR testi kullanılmaktadır. RT-PCR'da ilk olarak viral RNA eldesi yapılmaktadır. Sonraki aşamalarda ise 5'UTR bölgesi oligonükleotid primerleri kullanılarak cDNA elde edilir ve PCR ile çoğaltılır (42).

Mevcut ticari kalitatif testler PCR'ye dayalı AMPLICOR HCV versiyon 2.0 ve bunun yarı otomatize versiyonu olan COBAS AMPLICOR 2.0'dır. COBAS AMPLICOR, AMPLICOR HCV versiyonuna göre daha avantajlı bir yöntem olup, özgüllüğü ve duyarlılığı daha yüksektir ve iş gücünü azaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda COBAS AMPLICOR'un duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %96 ve %100 bulunmuştur (122).

Yine son zamanlarda Transkripsiyon Aracılı Amplifikasyon (Transcription-Mediated Amplification: TMA) tabanlı VERSANT HCV RNA testi de kullanıma girmiştir. Bu testle PCR'nin; RNA eldesi, çoğaltılması ve RNA'yı spesifik saptama basamakları tek bir tüpte gerçekleştirilmektedir. Bu testin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %98 bulunmuştur (123).

### 2.1.8.2.2. Kantitatif testler

HCV kantitatif viral testlerin, antiviral tedaviye yanıtın belirlenmesi gibi birçok önemli klinik uygulama alanı vardır. Kantitatif testler çeşitli çoğalma prensiplerini kullanır ve hedef molekül virusun RNA'sıdır. Bugün HCV kantitasyonuna yönelik, PCR temeline dayanan Amplicor HCV Monitor testi ve PCR dışı dallanmış DNA (bDNA) testi kullanılmaktadır (117).

bDNA testi işaret (signal) çoğaltma yöntemidir. Uygulanışı EIA testine benzeyen bDNA testinde çoğalan nükleik asitler değil onlara bağlanan işaretlerdir. Bu yöntem diğer hedef çoğaltma yöntemlerine göre biraz daha az duyarlıdır ancak, 'carry over' denilen kontaminasyon bu yöntemle daha az olur. 3 nesil bDNA testi olup bu 3 nesil boyunca duyarlılığı ve doğrusalığı geliştirilmiştir. Diğerlerine göre daha duyarlı olan 3. nesil bDNA test ticari olarak bulunmaktadır (117).

Amplicor HCV Monitor testi, ekstraksiyon aşamasından itibaren tüm aşamaları kontrol edilebilen bir PCR temelli yöntemdir. Bu testte sonuçlar UI/ml olarak verilir. Yüksek viral yük düzeyini ölçmede bDNA bu testten daha iyi olmasına rağmen, bu test bDNA testinden daha duyarlıdır (42).

Son zamanlarda bazı laboratuvarlarda çeşitli cihazlar kullanılarak HCV RNA için RT-PCR testleri yapılmaktadır. Bu testler daha hızlı, daha otomatize ve güvenilir olduklarından HCV RNA kantitasyonunda gerçek bir ilerleme sağlamışlardır (124).

### HCV Genotipleme

HCV genotip tayini yapmak, tedavinin süresini, dozunu yönlendirdiği ve tedaviye yanıtın en iyi belirleyicisi olduğundan önemlidir. Genotiplerede altın standart dizilemedir ancak geniş ölçekte tanısal kullanım için çok pahalı ve zaman alıcıdır. Kor, E1 ya da NS5B proteinleri herhangi biri PCR ile çoğaltılarak dizi analizlerinin yapılmasıyla genotip belirlenebilir ve benzer sonuçlar alınır (125).

Ticari genotipleme testlerinin çoğu virusun 5'UTR bölgesini hedefler ancak bu bölgeyi hedefleyen testlerden birçoğu subtiplemeyi tam anlamıyla doğru yapmamaktadır. HCV klinik izolatlarının 5'UTR tabanlı genotiplendirmesini yapan testlere örnek olarak; 5'UTR bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve daha sonra restriksiyon



enzimlerinin kesimi ile yapılan Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (*Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP*) ile genotiplendirme, 5'UTR bölgesinden köken alan biyotinlenmiş PCR ürünlerinin nitroselüloz şeritler üzerindeki tipe özgü problarla hibridizasyonu esasına dayalı bir yöntem olan 'line probe assay' (LIPA) ve erime eğrisi analizi ile birlikte 5'UTR bölgesini hedef alan 'floresan rezonans enerji transfer' (FRET) problemlerini kullanma temeline dayanan RT-PCR testi verilebilir (117, 119).

Bu testlerin RIBA ve EIA gibi serolojik yöntemlerde NS4 ve kor bölgesine karşı genotipe özgü antikorları saptamada kullanılmıştır. RIBA ile 6 yerine 3 ya da 4 serotip saptanırken kullanımdaki EIA testleri tüm 6 serotipi saptayabilmektedir. Yapılan değişik çalışmalarda serotipleme, LIPA ve dizileme yöntemleri arasındaki uyum iyi bulunmuştur (117).

## 2.2. Viral Onkogenez

### 2.2.1. Kanser ve Oluşum Mekanizmaları

Kanser, kendini göstermesi, gelişimi ve sonuçları açısından bir hastadan diğerine çok değişken olan, kompleks bir hastalıktır. Aynı heterojenlik ve çeşitlilik hücresel ve moleküler düzeyde de kendini gösterir. Kanser, hücrelerin metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirerek, aşırı ve zamansız çoğalmasına, immün sistemden kaçmalarına ve uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmasına yol açan çok basamaklı bir süreçtir (126).

Kanser oluşumunu meydana getiren ajanlar; fiziksel, kimyasal, viral gibi çevresel kaynaklı veya ailesel kanser sendromlarını içeren kalıtsal kaynaklı olabilmektedir. Kanser oluşumun başlangıç noktası bu kanserojenik ajanların oluşturduğu mutasyonlardır. Kanser normal hücre özelliğini değiştiren genlerin ekspresyonundaki değişime neden olan mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (127).

Hücre bölünmesi sırasında meydana gelen rastgele mutasyonlar, gen değişimleri veya kanserojenlerin etkisiyle meydana gelen transformasyonlar kanser oluşumunun ilk ve en önemli basamağıdır. Transforme hücrelerin tümör dokusuna dönüşmeleri ve kanserin klinik özelliklerinin ortaya çıkması için; Transforme hücrelerde, karakteristik hücre şeklinin kaybı gibi morfolojik; DNA sentezinin artışı, kromozom kırıkları, anormal kromozomlar gibi genetik değişikliklerin olması gerekmektedir (128).

Kanser oluşumuna neden olan mutasyonlar incelendiğinde karşımıza 3 hücresel gen grubundaki değişimler çıkar (128):

- 1- **Proto onkogenler ve Onkogenler:** Hücre sinyal iletimi ve hücre döngüsünün kontrolünde yer alan genlerdir. Proto onkogenlerdeki mutasyonlar sonucu bu genler onkogenlere dönüşmektedir. Proto onkogenlere örnek olarak, onkogenlerin önemli bir ailesi olan siklinleri ve Siklin Bağımlı Kinazları (CDK) içeren hücre siklusu regülatörleri verilebilir (128).
- 2- **Tümör Baskılayıcı Genler:** Normal görevi hücre döngüsünün ilerlemesini ve hücre bölünmesini inhibe etmek olan proteinleri kodlayan genlerdir. Hasara

uğradıklarında ya da ortadan kalktıklarında hücrenin denetimsiz çoğalmasına neden olurlar. Tümör süpresörlere örnek olarak Retinoblastoma (Rb) geni ve p53 geni verilebilir (129).

- 3- **DNA Tamir Genleri:** DNA replikasyonu sırasında meydana gelen hataların ve genomik DNA'da çeşitli etkenlerle oluşan bozuklukların tamiri görevini gerçekleştiren proteinleri kodlayan genlerdir. Bu genlerde izlenen mutasyonlar, DNA tamiri mekanizmasını bozarak başka genlerde de mutasyon oluşumuna ve kanser gelişmesine neden olur (128).

Tümör süpresör gen inaktivasyonları ve onkogenlerin aktivasyonu, hücrenin kontrolsüz çoğalması ve metastaz yeteneği kazanması gibi malign özellikler kazanmasına yol açar. Hücre döngüsünde rolü olan proto onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur (130).

### 2.2.2. Onkojenik Viruslar

Tümör virusleri, hücre sel dönüşüm süreçlerinin moleküler mekanizmalarını anlamak için manipüle edilebilir basit genetik sistemlere sahiptirler. Tümör virolojisi alanındaki bilgilerin giderek artması, hedeflenen tedavi için başarı şansını arttırmaktadır. Ancak daha iyi tedavi stratejileri geliştirmek amacıyla, kanserin progresyonunda bu viruslar tarafından kullanılan çoklu mekanizmaları daha iyi anlamak için daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır. İlk insan tümör virusu Epstein-Barr virus (EBV)'ün 1964'de tanımlanmasına kadar, virusların sadece hayvanlardaki kanserlerde etken ajan olarak rol aldığına inanılıyordu. Daha sonra kaposi sarkomu ilişkili Herpesvirus (KSHV), human papilloma virus (HPV), Hepatit B virüsü (HBV), Hepatit C virüsü (HCV), insan T hücre lenfotropik virüsü (HTLV-1) ve son zamanlarda tespit edilen Merkel hücreli polimavirus (MCPyV) gibi çeşitli insan tümör virusları tespit edilmiştir. Tümör virusları EBV, KSHV, HPV, HBV ve MCPyV içeren DNA virusları ya da HCV ve HTLV içeren RNA virüsü olarak kategorilendirilmiştir (Çizelge 2.6) (128, 131).

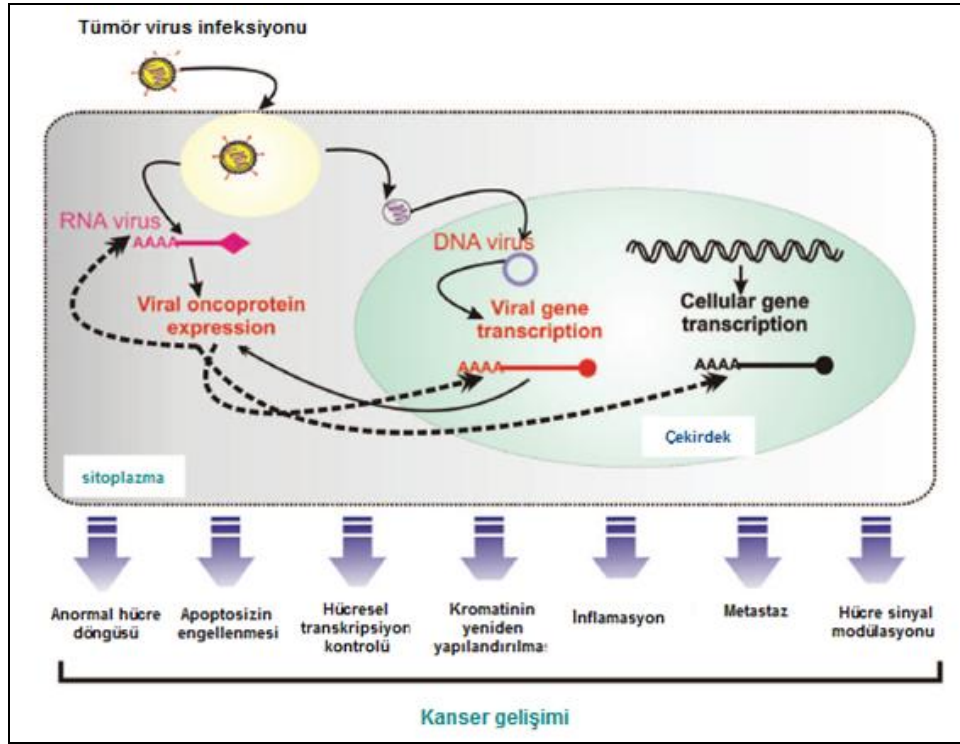
**Çizelge 2.6.** İnsan kanserleri ile ilişkili viruslar (128)

<b>RNA virusları ve ilişkili oldukları kanserler</b>	
HCV	Hepatosellüler karsinoma
HTLV	Erişkin T hücre lenfosittik lösemi
<b>DNA virusları ve ilişkili oldukları kanserler</b>	
EBV	Burkitt lenfoma, Nazofaringeal karsinoma, İmmün baskılanmış kişilerdeki B hücreli lenfoma,
KSHV	Hogkin hastalığının bazı klonal formları X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom Kaposi sarkomu
HPV	Servikal kanser
HBV	Hepatosellüler karsinoma

Tümör virusları farklı hücresel yolları etkileyerek tümör oluşumlarını indüklerler. Böylece tümör virusları, hücresel savunma sistem mekanizmalarından, içinde bulunduğu hücrenin canlılığını devam edilmesini sağlayarak kurtulabilmektedir (132).

Tümör viruslarının kanser oluşumuna neden olan mekanizmaları dolaylı ve karmaşıktır. Bu virusların konakla ilişkileri ve yapısal özellikleri birbirinden farklı olsa da; konak hücreleri arasında hızla çoğalan hücrelerinin bulunması, ürettikleri proteinlerin hücre içi sinyal yolları, hücre döngüsü ya da apoptozu etkilemesi gibi ortak özellikleri de vardır. Viruslar konak hücrenin infeksiyon üzerine mitotik kontrol noktalarını bozarak, infekte hücrelerin poliferasyonuna ve ölümsüzleşmesine yol açan

bir dizi hücreyel olaylar başlatırlar. Bu olaylar sıklıkla, kodlanan viral gen ürünleri tarafından birçok tümör süpresör proteinini proteozomal bozulma ya da fonksiyonel inhibisyonuyla başarılır. İnfekte olmuş hücrelerde ya kronik infeksiyon durumu devam edebilir ya da hücreyel kaynaklı apoptosiz aracılığıyla ortamdan kaldırılabilirler. Kronik infeksiyon durumunun devamı onkogeneze yol açabilir (Şekil 2.7) (132, 133).



Şekil 2.7. Tümör virusları kanser gelişim mekanizmaları (132)

### 2.2.3. HCV'nin Hepatosellüler Karsinoma ile İlişkisi

Hepatosellüler karsinoma genellikle siroz gelişen hastalarda uzun bir süreç sonunda gelişmektedir ancak tanımlanmış kanser hastalarında HCV infeksiyonunun ilerleyişi altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir (14).

DNA hasarı için potansiyel ve oksidatif stres ile ilişkili uzun süreli hepatik inflamasyon ve sirozun varlığını da içeren dolaylı mekanizmaların kanser gelişimine katkısı muhtemeldir. Ancak HCV'nin protein ekspresyonlarının doğrudan onkogenik olabileceği düşünülmektedir (Şekil 2.9) (15).

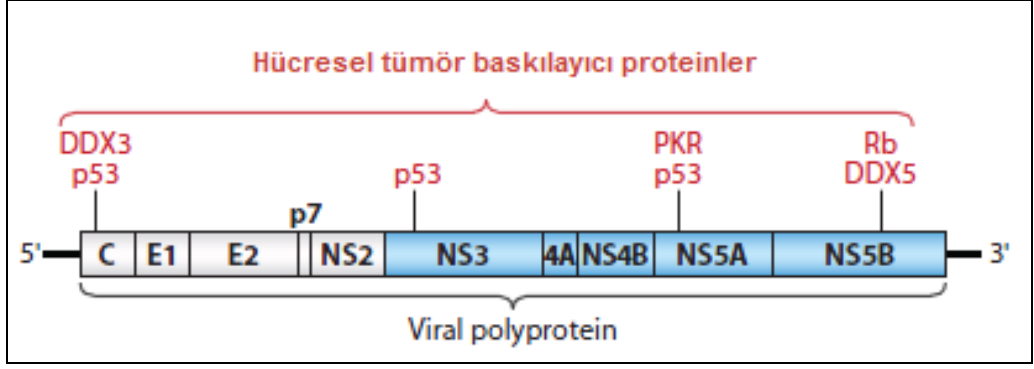
Birçok kanser türünde olduğu gibi HSK'da da p53 ve Rb (Retinoblastoma) tümör süpresör proteinleri sıklıkla mutasyona uğramaktadır. Yapılan birçok araştırmada HCV proteinlerinin p53 ile etkileşime geçtiği belirlenmiştir (16, 134). Bu etkileşim çok açık olmamakla birlikte p53'ün normal fonksiyonlarını etkilediği bilinmektedir. Bunlara örnek olarak HCV tarafından kodlanan kor, NS3 ve NS5A proteinleri verilebilir. Bu etkileşimlerin araştırıldığı çalışmalarda farklı HCV izolatları kökenli NS3 proteinlerinin p53 ile doğrudan etkileşime geçerek, p53 bağımlı transkripsiyonu inhibe ettiği öne sürülmüştür (135). Yapılan başka bir çalışmada kor proteininin p53 ile etkileşime geçerek transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı gözlenmesine karşın başka bir çalışmada ise transkripsiyonel aktivitesini baskıladığı bildirilmiştir (136). NS5A proteininin ise p53 ile etkileşimi bildirilmesine karşın onkolojik potansiyelinin olmadığı düşünülmektedir (Şekil 2.8) (137).

Birçok DNA tümör virus onkoproteinlerinin Rb yolaklarını hedef aldığı bilinmesine karşın RNA virusları tarafından kodlanan proteinlerinin böyle bir rolü bilinmemekteydi. Kesin mekanizması belli olmamasına rağmen HCV'nin Rb yolağını regüle ettiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda kor proteininin Rb proteininin yarı ömrünü azaltarak etkinliğini düşürdüğünü (138), Rb ekspresyon seviyesinde azalma oluşumunu ve NS5B bağımlı etkileşim (139) ile normal nükleer lokalizasyonunun değişerek sitoplazma yönüne kaymasını sağladığını (140) ve selüler proliferasyonu arttırdığı (139) ileri sürülmüştür. HCV Rb etkileşimi büyük oranda NS5B proteinin temelinde normal lokalizasyonu çekirdekte olan Rb proteini sitoplazmada bulunan NS5B proteini ile kompleks oluşturması sonucu sitoplazmaya çekilmesidir (140, 141). Tüm bu süreçlerin sonunda infekte hücrelerdeki Rb yolaklarının işlevini yitirmesi sonucu hepatosellüler proliferasyon ve kromozomal kararsızlığın oluşumu sonucunda karaciğer kanserine yönelim başlar (14).

HCV proteinlerinin p53 ve Rb ile olan bu potansiyel etkileşimleri, aktif p53 ve Rb yolaklarını gerektiren hücre döngü kontrol mekanizmalarının etkili çalışmamasına neden olur (17). HCV kor, NS3 ve NS5A proteinlerinin p53 ve Rb tümör süpresör proteinleri ile etkileşimlerinin yanında DDX3\*, DDX5\*, DExD/H\* diğer bazı hücrel proteinlerle etkileşime geçerek lokalizasyonların değişmesini sağlar (142).

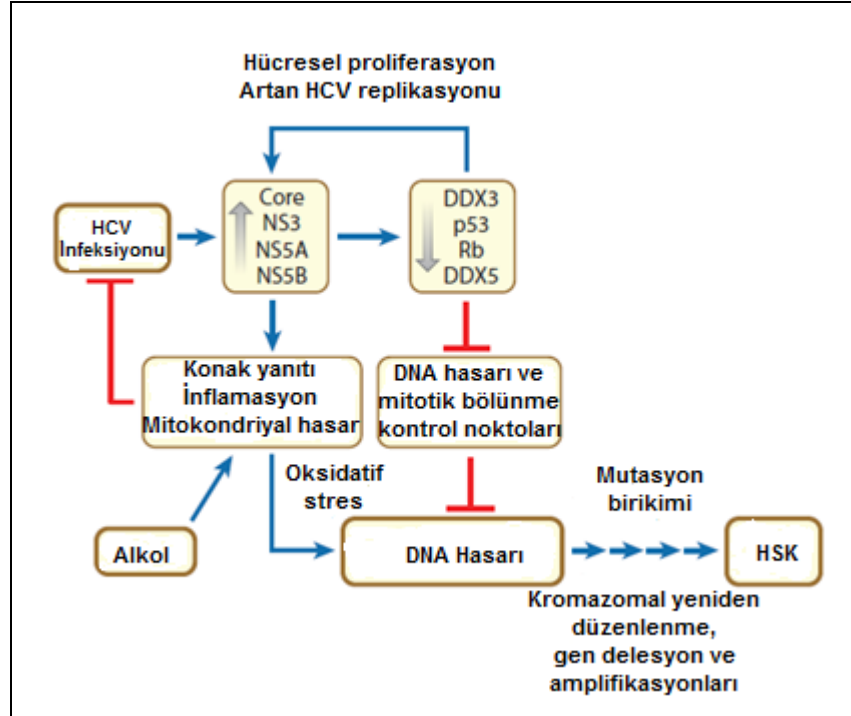
---

\* ATP bağımlı DNA helikaz. Hücrelerde translasyonun başlamasında ve proteinlerin işlenmesi gibi RNA metabolizmasında görevli proteinler



Şekil 2.8. Tümör baskılayıcı proteinler ile ilişkisi olduğu düşünülen HCV proteinleri (14)

Bir pozitif polariteli RNA virüsü olarak HCV replikasyonu sitoplazmada gerçekleşir ve diğer birçok tümör viruslarında viral genom konak kromozomal DNA'sına entegrasyon potansiyeli olmasına karşın HCV'de böyle bir potansiyeli olmadığı düşünülmektedir (14).



Şekil 2.9. HCV ile kronik infekte HSK oluşumunun olası hüresel yolları (14)

## 2.3. miRNA ve HCV

### 2.3.1. miRNA'lar

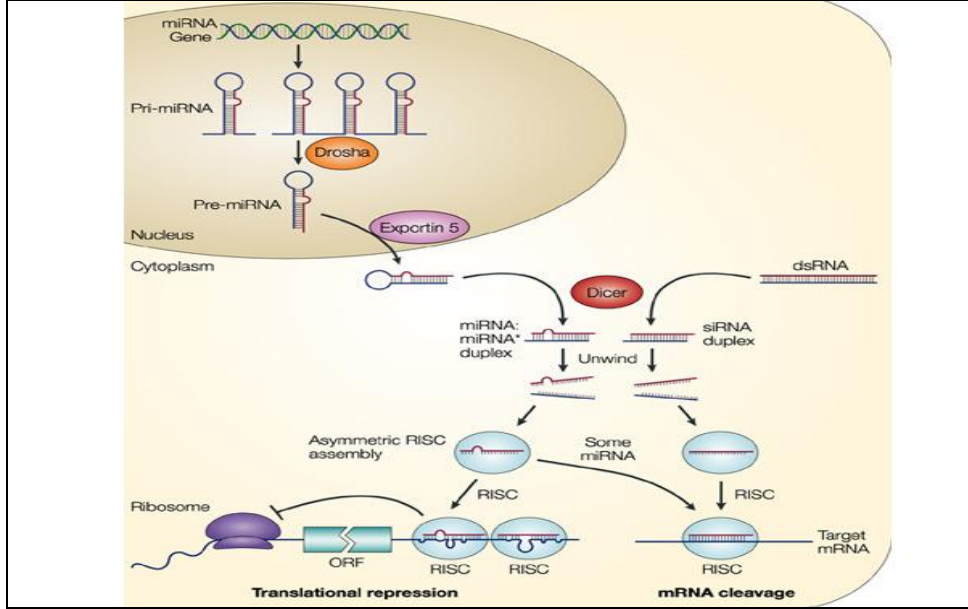
miRNA'lar endojen olarak sentezlenen yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda olan küçük RNA'lardır. Translasyonel represyon veya klevaj sonucu degradasyon yolu ile gen ekspresyonunun regülasyonunda görev alırlar. Karakteristik olarak gövde loop'u veya saç tokası şeklindeki prekürsörlerden derive olurlar (19). Bu saç tokası yapılar Pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptlerdir ve bu transkriptler önce pre-miRNA (prekürsör) adlı kısa sap-ilmik yapılarına, sonra da fonksiyonel (olgun) miRNA'lara dönüşürler (145). Bu kısa RNA dizileri, hedef mRNA'ların 3'UTR bölgelerine düzensiz ssRNA (Single-stranded RNA) bağlanması yoluyla gen regülasyonu fonksiyonu gerçekleştirirler (146). Bu fonksiyonları nedeniyle, miRNA'lar konak transkriptozomları ve proteomlarının şekillenmesinde ve dolayısıyla selüler fizyolojide pivotal bir role sahiptirler. Konak genlerin modülasyonunda, hücrel gelişim, farklılaşma, proliferasyon, metabolizma, immünite ve ölüm gibi oldukça geniş bir biyolojik yollar aralığındaki birçok olayla ilişkilidirler (147). Çeşitli hücrel fonksiyonlarda yer alan miRNA disregülasyonunun anlaşılması ile beraber kanser ve viral faktörler ile indüklenen insan hastalıkları ile olan ilişkileri de her geçen gün daha net bir şekilde anlaşılmaktadır (20,21). Bilgisayar hesaplamaları ve deneysel analizler bir tek miRNA'nın birden fazla, potansiyel olarak yüzlerce mRNA'yı hedefleyebileceğini, ayrıca çeşitli miRNA'ların aynı geni hedefleyebileceğini göstermiştir (148). *Caenorhabditis elegans* 'ta ilk olarak keşfedilmelerinden beri insan genomunda 1000'den fazla miRNA identifiye edilmiştir (149).



### 2.3.2. miRNA Biyogenezi

miRNA'ların hayvan hücrelerindeki biyogenezi 3 başarılı üretim aşamasında gerçekleşmektedir (Şekil 2.10) (150) ;

- (i) kendisini kodlayan genlerden primer miRNA transkriptinin (pri-miRNA) jenerasyonu,
- (ii) nükleusta pri-miRNA'dan miRNA prekürsör formuna (pre-miRNA) kısmi geçiş prosesi,
- (iii) matur bir miRNA oluşturmak üzere sitoplazmaya translokasyon esnasında gerçekleşen ilave olgunlaşma prosesi



Şekil 2.10. miRNA biyogenezi (151)

miRNA konik yolağında, miRNA dizisi RNA polimeraz II (RNA Pol II) tarafından saç tokası yapısına sahip uzun pri-miRNA'lar olarak transkribe edilir (150). Pri-miRNA'lar daha sonra mikroişlemci olarak bilinen bir enzim kompleksi (RNase III'e sahip Drosha enzimi ve nükleer protein *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*, DGCR8 veya omurgasızlarda Pasha olarak bilinen) ile 60 -70 nt uzunluğunda bir pre-miRNA gövde ilmeği oluşturmak üzere prosesin ilk aşamasına girerler. Nükleer eksport

faktörü Exportin-5 (Exp5) tarafından sitoplazmaya yapılan aktif transportu takiben, pre-miRNA'lar RNase III-Dicer enzim kompleksi ile yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki matur dupleks miRNA'ya dönüştürler (152). Bu matur saç tokası miRNA yapısı hedef mRNA'ya komplementer fonksiyonel bir rehber zinciri ve daha sonra degrade olan bir yolcu zincir yapısı taşır. Rehber zincir selektif olarak RNA ile indüklenen susturma kompleksi *RNA-induced silencing complex* (RISC veya miRISC)'nin çekirdeğini oluşturmak üzere Argonaute (AGO) 2 proteini ile etkileşir. Matur miRNA RISC kompleksine yüklendiğinde, hedef mRNA'nın 3'UTR'si ile etkileşmek üzere komplekse rehberlik eder. Bu proses ya mRNA translasyonunun baskılanması (tam olmayan baz eşleşmesi olduğunda) veya mRNA'nın klevajı ve degradasyonu (tam komplementer bağlanma olduğunda) ile sonuçlanır (150). Hedef tanımada bağlanma özgülüğüne miRNA'nın çekirdek bölgesinin aracılık ettiğine inanılmaktadır (148).

### 2.3.3. Karaciğer gelişimi ve hastalıklarında miRNA'lar

miRNA'ların genellikle hastalık patolojilerindeki rolleri açıklanmaya çalışılırken hücrel büyüme ve karaciğer gelişimindeki gen represyonundaki fonksiyonel rolü üzerinde daha az çalışma yapılmaktadır. Özellikle let-7 ve lin-4 gibi miRNA'lar *Caenorhabditis elegans*'ta larval gelişme kontrolünde ve *Drosophila*'da apoptotik yollar ve büyüme kontrolünde rol oynamaktadır (153). Son yıllarda yapılan çalışmalar, insan hücrelerinin farklılaşmasında ve organların şekilsel bütünlüğünün gelişiminde miRNA'ların doku spesifik ekspresyon gösterdiğini önemli bir şekilde ortaya çıkarmaktadır. miR-122, toplam karaciğer miRNA popülasyonunun yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır. Bununla beraber bu miRNA'nın HCV infeksiyonu ve hepatosellüler karsinoma gibi hastalıklarla ilişkili fonksiyonu hakkındaki bilgiler henüz çok net değildir (154). Xu ve ark. miR-122 ekspresyonu ve bu miRNA ile regüle edilen ve hepatosit gelişimi ve fonksiyonu için gerekli olan karaciğer transkripsiyon faktörleri (LETfs) C/EBP  $\alpha$ , HNF1 $\alpha$  ve HNF3 gibi izoformların, karaciğerin embriyonik gelişimi süresince oldukça artmakta olduğunu göstermişlerdir (155).

#### **2.3.4. Antiviral savunmada miRNA'lar**

Viral infeksiyonlarda miRNA mekanizmalarının yeri ile ilgili çeşitli senaryolar vardır. Hem viruslerin hemde konak hücrelerinin miRNA kodladıkları bilinmektedir. Bu küçük RNA yolakları viral infeksiyonlar ile mücadele etmek için konak immün savunma mekanizmalarının regülasyonunda yer alabilirler. Yani viral infeksiyonların konak savunmasında, doğal ve adaptif immünitide görev alan immün hücre popülasyonunun gelişmesinde, olgunlaşmasında, hayatta kalmasında ve fonksiyonel olmasında düzenleyici olarak yer alabilirler (156). Hücresel düzeyde, miRNA'lar viral replikasyonun sınırlandırılmasında rol almaktadırlar. Örneğin insan hücre kültürlerinde, miR-32'nin retrovirüs primate foamy virüs tip-1'in represyonunda görev aldığı belirlenmiştir (157). Benzer şekilde çeşitli insan miRNA'larının HIV 3'UTR bölgesini hedeflediği, TLR3 (Toll-like receptor 3) aktivasyonunun monositlerde ve makrofajlardaki HIV infeksiyonunu sınırlamak üzere kendi ekspresyonlarını tetiklediği de belirlenmiştir (158). Son olarak, IFN-beta'nın çeşitli hücresel miRNA'ları indükleyerek HCV replikasyonunu sınırladığı ve bu mekanizmanın virusa karşı IFN'ların anti-viral etki oluşturmaya neden olduğu düşünülmektedir (159).

#### **2.3.5. Karaciğerin viral infeksiyonlarında miRNA'lar**

Viral hepatit C infeksiyonu, alkolik olmayan steatohepatit (NASH) dışında hepatik fibroz ve sirozun en yaygın global nedenlerinden birisidir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, tüm dünyada 180 milyondan fazla insan HCV ile infekte durumda olup bu popülasyonun yaklaşık >%70'inde siroz gelişme riski vardır (160). İnterferon ile kombine ribavirin tedavisi, kronik hepatit C tedavisinde etkili olmakla beraber, infekte popülasyonun büyük bir kısmının mevcut tedavi rejimlerine yanıt vermemesinden dolayı yeni ilaç tedavilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu sebepten dolayı hücresel infeksiyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. miR-122'nin hepatik fonksiyon, karaciğer hastalığı ve HCV replikasyonunu da içeren çeşitli fonksiyonlarını açıklamaya çalışan birçok çalışma vardır (161). miR-122'nin plazma düzeyleri HBV ve HCV ile infekte hastalarda artış göstermesi, bu miRNA'nın biyomarkır olarak değerlendirilebileceğini kuvvetle desteklemektedir (162). Bununla

birlikte Ura ve ark. tarafından son yıllarda yapılan çalışmalar HBV ve HCV ile infekte karaciğerlerde miR ekspresyon paternlerinin farklılıklar gösterdiğini göstermiştir. Bir diğer miRNA olan miR-196'nın, insan hepatositlerinde in-vitro şartlarda HCV ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (163). HCV ile infekte hepatoma hücrelerinde yapılan miRNA/mRNA profilleme çalışmaları, total 108 miRNA'nın eksprese olduğunu göstermiştir. Bu havuz içerisinde miR-24, miR-149, miR-638 ve miR-1182'nin hücreye HCV girişini, replikasyonu ve viral çoğalmayı kontrol ettiği sonucuna varılmıştır (164).

Scagnolari ve ark. sağlıklı ve HCV ile infekte hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinde miRNA ekspresyonunu araştırmış ve miR-1, miR-30, miR-128, miR-196 ve miR-296 ekspresyon düzeylerinde farklılıklar bulmuşlardır (165). Bir tümör baskılayıcı gen olan DLC-1 miR represyonunun hedeflerinden birisidir. HCV ile infekte hücrelerde DLC-1 düzeyleri düşmekte, bununla korele bir şekilde miR-141 ekspresyonu artmaktadır. miR-141'in tükenmesi viral replikasyonu inhibe ederken eksojen kaynaklı miR-141 ilavesi viral replikasyon oranlarını artırır (166).

### **2.3.6. miRNA'ların HCV infeksiyonundaki rolü**

Diğer birçok virusun replikasyon stratejisinde olduğu gibi HCV de, hücrel miRNA'lar ile etkileşmektedir (Çizelge 2.7). HCV hayat siklusunda yer alan bu miRNA'lardan birisi miR-122'dir. miR-122 karaciğer spesifik bir miRNA olup (her hücrede ortalama 66.000 kopya) karaciğerdeki tüm miRNA'ların yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır. miR122 hemen hemen sadece karaciğerde bulunan bir mikroRNA olup akciğer, kalp, beyin, böbrek, dalak, pankreas, ince ve kalın bağırsaklar, testis, yumurtalık, timus ve iskelet kaslarında tesbit edilmemektedir (167). miRNA'nın karaciğerdeki en iyi bilinen fonksiyonu, lipid ve kolesterol mekanizmasını düzenlemesidir (147). İlginç bir şekilde miR-122'nin, HCV'nin viral üretimi ve etkin replikasyonu için gerekli bir konak faktörü olduğu da tanımlanmıştır (22, 23). Bununla birlikte miR-122'nin HCV amplifikasyonundaki aracılık fonksiyonu net olarak bilinmemekle beraber bu mikroRNA'nın HCV RNA birikimine katkı sağladığı ve bundan dolayı da viral amplifikasyon hızının arttığı düşünülmektedir (22, 24).

miR-122'nin yanı sıra diğer bazı miRNA'ların da HCV infeksiyonunda rol oynadığı bilinmektedir. miR-199a'nın HCV genomunun 5'UTR'indeki SL II bölgesine

bağlanarak HCV replikasyon etkinliğini azalttığı gösterilmiştir (23). Bu miRNA çeşitli insan dokularında değişik düzeylerde eksprese edilmekle beraber insan karaciğerinde düşük miktarlarda bulunmaktadır (23).

HCV ile interaksiyona giren diğer bir endojen miRNA ise miR-141'dir. HCV enfeksiyonunda primer hepatositlerde miR-141 intrasellüler düzeyinin arttığı bildirilmiştir (168). Ayrıca miR-1, miR-30, miR-128, miR-196, miR-296, miR-351, miR-431 ve miR-448 gibi bazı miRNA'ların interferon beta tedavisi ile indüklendiği bildirilmiştir. Aynı zamanda interferon beta tedavisi süresince miR-122 ekspresyon düzeyinde de önemli bir azalmanın gerçekleştiği de gözlenmiştir (159).

**Çizelge 2.7.** miRNA'ların HCV enfeksiyonundaki anormal ekspresyonları (154)

<b>miRNA</b>	<b>HCV enfeksiyonundaki Ekspresyonları</b>
122	Artmış
let 7f	Artmış
155	Artmış
146	Artmış
296	Artmış
351	Artmış
128	Artmış
296	Artmış
141	Artmış
196	Azalmış
15a/15b	Azalmış
17	Azalmış
106a/106b	Azalmış
181a	Azalmış
29a/29b	Azalmış
93	Azalmış
310	Azalmış

**Çizelge 2.7.** miRNA'ların HCV enfeksiyonundaki anormal ekspresyonları (154) (devam)

miRNA	HCV enfeksiyonundaki Ekspresyonları
30a/30c	Azalmış
24	Azalmış
221	Azalmış
222	Azalmış

### 2.3.7. Karaciğer fibroz/siroz'unda miRNA'lar

Kardiyak ve renal fibroz gibi farklı organ sistemlerinin fibrotik bozuklukları arasında, miRNA ekspresyon profili bakımından ortak noktalar bulunmaktadır. miR-29 ailesinin efektör hücresel farklılaşma veya ekstrasellüler matriks komponentlerinin düzenlenmesinde etkili olduğu görülmektedir (169). Rodenburg ve ark. CCl4 rodent hepatik fibroz modelinde miRNA ekspresyon profillerini araştırmışlar ve mikroarray analizleri 31 farklı düzeyde eksprese olan miRNA'yı ortaya çıkarmıştır. Bunlardan miR-125p, miR-199b ve miR-302c, fibrotik dokularda aşırı ekspresyon gösterenlerdendir. Aynı zamanda özellikle miR-29 familyası üyelerinin de içerisinde bulunduğu 21 miRNA ekspresyonunda önemli ölçüde azalma olduğu da belirlenmiştir. Buna ilaveten Desmet fibrozu olan ve 2-4 arası skora sahip olan karaciğer transplantasyonlu hastalarda miR-29a/b/c ekspresyonlarında azalma saptanmıştır. Bu hastalarda miR29a'nın plazma konsantrasyonları düşük bulunmuş olması ileri düzeyde karaciğer fibrozu ve bunun ilerisinde de karaciğer sirozu ile ilişkilendirilmiştir (Çizelge 2.8) (170).

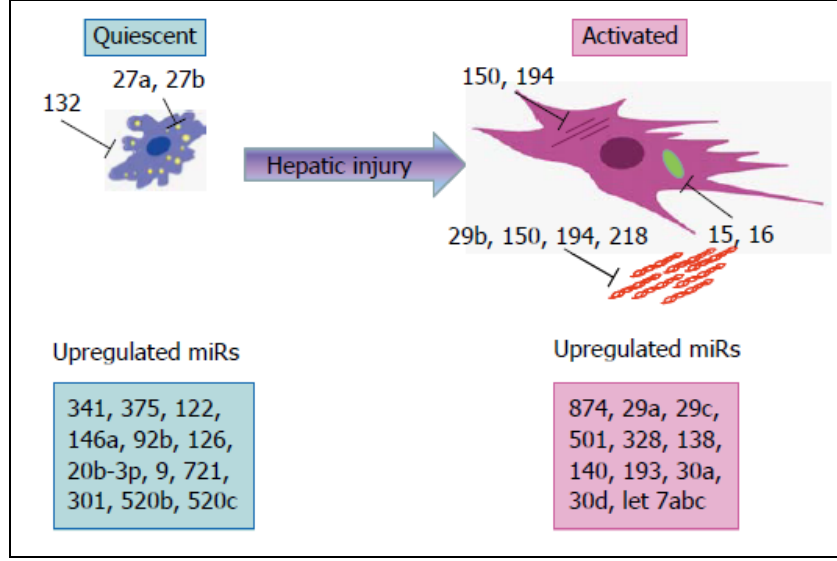
Hepatik fibroz, yara iyileşmesi cevabını kontrol eden çeşitli epigenetik faktörlerden etkilenecek oluşur. Mann ve ark. son zamanlarda 2 farklı modelde (BDL, CCl4) yapmış oldukları çalışmalarda fibrotik karaciğerde miR-132 ekspresyon düzeyinde önemli düzeyde azalma olduğunu ve bu azalmanın hepatik stella hücrelerinin aktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir (171).

**Çizelge 2.8.** miRNA'ların Fibroz'daki anormal ekspresyonları (154)

miRNA	Fibroz'daki Ekspresyonları
125-5p	Artmış
199b	Artmış
221	Artmış
302c	Artmış
223	Artmış
34c	Artmış
24	Artmış
29a/29b/29c	Azalmış
30b/30c	Azalmış
183	Azalmış
877	Azalmış
96	Azalmış

### 2.3.8. Hepatik Stella Hücrelerinde miRNA'lar

Hepatik fibrozda hepatik stella hücreleri, tip I kollojen depozisyonunu takiben ortaya çıkan hasar oluşumunda yer alan esas efektör hücre popülasyonudur. Viral enfeksiyon, obezite, alkol tüketimi gibi çeşitli kaynakları içeren hasarlanmalar hepatik stella hücrelerinin aktivasyonuna neden olur ve bu durum lipit bakımından zengin ve durağan fazda bulunan hücrelerin tam olarak aktive olmuş miyofibroblast dönüşümüne yol açar. Hepatik stella hücrelerinin aktive olmuş formu TGF-beta (Transforming growth factor) gibi profibrojenik mediatörleri sekrete eder ve fibriller kollojenler, fibronektin ve laminin gibi yara iyileşmesi sürecinde yükselen ekstrasellüler matriks komponentlerini oluşturur (172). Son yıllarda yapılan çalışmalar hepatik stella hücre farklılaşmalarında miRNA'ların yer aldığını ortaya koymuştur (Şekil 2.11)(154).



Şekil 2.11. Hepatik stella hücre farklılaşmasında miRNA'ların rolü (154)

Özellikle miR-150, miR-187, miR-194 ve miR-207 gibi miRNA'ların ekspresyon seviyeleri azalırken let-7 familyası üyesi miRNA'ların ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde artmaktadır (171). İnsan hepatik stella hücrelerinde miR-150 ve miR-194'ün aşırı eksprese olması hücre proliferasyonunun inhibe olmasına neden olmaktadır. Bununla beraber, aynı zamanda tip-I kollojen ve düz kas alfa aktin (alfaMSA)'da ortaya çıkan düşüşler hepatik stella hücre aktivasyonunun en önemli göstergeleridir. Bu 2 miRNA'nın spesifik aksiyonu sonucunda c-Myb ve Ras ile ilişkili C3 botulinum toksin substrat 1(Rac-1)'in inhibe olması ve fibroz gelişimi ve ilerlemesine neden olur (171).

### 2.3.9. Hepatosellüler karsinoma'da miRNA'lar

İnsan karaciğer kanserlerinde birçok miRNA'nın ekspresyonunda anormallikler vardır. Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda hepatosellüler karsinoma ve non-neoplastik doku miRNA'ları karşılaştırıldığında, hepatosellüler karsinoma'lardaki miRNA ekspresyonlarında kural dışı çeşitli anormallikler olduğu gösterilmiştir (174). HSK'da anormal olarak eksprese edilen miRNA'lar Çizelge 2.9'de gösterilmiştir. Bunlara ilaveten bazı miRNA'ların aynı zamanda diğer neoplizm'lerde de regülasyon bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir. Örneğin, miR-221/222'nin ekspresyon



seviyelerindeki artışı kolon, mide, mesane karsinomalarında ve glioblastomalarda, miR-21'in ekspresyon seviyesindeki artışı yumurtalık, akciğer, göğüs karsinomalarında gösterilmiştir. Bunlara ilaveten miR-199a, miR-200b ve miR-214 ekspresyonlarının yumurtalık kanserinde, miR-199b yumurtalık ve akciğer kanserlerinde azaldığında bildirilmiştir. Bu miRNA'ların karaciğer tümörogenezindeki rollerini desteklemek amacıyla sikline bağımlı inhibitörlerden p27/CDKN1B ve p57/CDKN1C veya PI3K antagonist fosfataz ve tensin homolog (PTEN) gibi hücre siklusu ve hücre ölümü regülasyonunda görev alan gen hedeflerinin, miR-221, miR-222 ve miR-21'in hedefleri olduğu da deneysel olarak valide edilmiştir. miR-373'te ekspresyon seviyesinde artış olan miRNA'lar arasında tanımlanmıştır. Bu onkojenik miRNA'nın, önceki çalışmalarda testiküler kanser ve göğüs kanser metastazlarında ekspresyon seviyelerinin arttığı bulunmuştur (175). miR-21, miR-210, miR-213 ve miR-181b gibi bazı miRNA'ların ekspresyonu hem hepatosellüler karsinoma'da hemde aynı zamanda hipoksik koşullarda artmaktadır. Hepatosellüler karsinomada ekspresyon seviyeleri azalan miRNA'lar arasında let-7 familyası üyeleri, miR-143 ve miR-145 bulunmaktadır (176).

Hepatosellüler karsinoma'da ekspresyon seviyesi azalan miRNA'lardan birisi de miR-122'dir. HSK'lı vakaların %70'inden fazlasında bu miRNA'nın ekspresyonunun azalmış olduğu bildirilmektedir (174).

İnsan kanserlerinde değişikliğe uğramış miRNA düzeyleri oldukça değişken olmakla beraber, tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin miRNA ekspresyonu aracılı regülasyonlu insan kanserlerinin tamamına yakınında gerçekleşmektedir (25). Hepatosellüler karsinomada miRNA ekspresyon paternlerinin karaciğer tümör ve normal komşu doku ve karaciğer sirozu ve normal komşu doku karşılaştırmalarının yapıldığı erken dönem çalışmaları, hastalık ile korele bir şekilde miRNA ekspresyon düzeylerinde spesifik değişiklikler gerçekleştiğini ortaya koymuştur (26,27). Ji ve ark. AFP pozitif tümör örneklerinde miR-181 familya üyesi miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin arttığını belirlemiştir (177). miR-181 familya üyeleri embriyonik karaciğerlerde ve izole hepatik kök hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese olduğu da belirlenmiştir. Ji ve ark. miR-181 ekspresyonu matur hepatosit-spesifik genlerle ilişkili olduğu için bu miRNA'nın ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin hepatosellüler karsinoma ile ilişkili olduğunu ifade etmektedir. Hepatosellüler karsinoma'da, sirotik

dokuda ve normal karaciğerde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda tümörlerde miR-221 ve miR-22 ekspresyon düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir (178). miR-221'in hepatosellüler karsinomadaki onkojenik rolü sıklıkla disregüle olmasıdır. Bu regülasyon bozukluğundan dolayı hedeflediği proteinlerden olan sikline bağımlı kinaz inhibitörü p27 ve PI3K/AKT/mTOR yolak regülatörü olan DDIT4'ün ekspresyonunda da düzensizlikler ortaya çıkmaktadır.

Hepatosellüler karsinoma için tasarlanan bir fare modelinde miR-221'in sadece kanser başlangıcını stimüle etmekle kalmayıp aynı zamanda tümör progresyonunu da arttırdığı bildirilmiştir (178). miR-222'deki aşırı ekspresyon hücreye AKT sinyal yolları aracılığı ile göç avantajları sağlayarak hepatosellüler karsinomalı hastalarda tedaviye yanıt oranını azaltmaktadır (179).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, miR-17-5p'nin hepatosellüler karsinomalı örneklerde normal örneklere göre ekspresyon düzeyinde önemli bir artış gösterdiği bildirilmiş ve bu miRNA'nın HSK tanısı için yeni bir prognostik markır olarak hizmet edebileceği belirtilmiştir (180). Başka bir çalışma, miR-223'ün ekspresyon seviyesinin azalma gösterdiğini ve prognostik öneme sahip olduğunu belirtmiştir (181). Diğer çalışmalarda ise, miR-24'ün 2 kat ve fazlası ekspresyon artışı gösteren miRNA'lar arasında yer aldığı (182) ve miR-24'ün hepatosellüler karsinoma'nın erken aşamalarında hem tanının konmasına hemde terapötik bir hedef potansiyeline sahip olan önemli bir hedef olduğunu öne sürmüştür (183).

**Çizelge 2.9.** miRNA'ların HSK'daki anormal ekspresyonları (166)

<b>miRNA</b>	<b>HSK'daki Ekspresyonları</b>
miR-18	Artmış
miR-21	Artmış
miR-221	Artmış
miR-222	Artmış
miR-224	Artmış
miR-122	Azalmış
miR-125a	Azalmış
miR-125b-1	Azalmış
miR-130a	Azalmış
miR-150	Azalmış
miR-199a-1-5p	Azalmış
miR-199a-2-5p	Azalmış
miR-199b	Azalmış
miR-200a	Azalmış
miR-200b	Azalmış

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Çalışmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalından KHC, Siroz ve HSK tanılarını almış; yaşları 20-74 arasında değişen 20 kadın ve 6 erkekten oluşan 26 KHC'li, yaşları 29-78 arasında değişen 18 kadın ve 12 erkekten oluşan 30 Siroz'lu, yaşları 48-86 arasında değişen 4 kadın ve 4 erkekten oluşan 8 HSK'lı, 64 hasta ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kan Bankasına başvuran sağlıklı 30 donörün kontrol grubu seçilmesi ile toplam 94 kişi dahil edilmiştir. Bu çalışma kapsamında hasta ve kontrol gruplarıyla, 28 Panel A (Çizelge 3.1) ve 30 Panel B (Çizelge 3.2) grubu ve 2 internal kontrol (RNU 48) olmak üzere toplam 60 miRNA'nın ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

Çizelge 3.1. Panel A miRNA Listesi

let-7f-5p	miR-29a-3p	miR-93-5p	miR-130a-3p	miR-199b-5p	miR-296-5p
miR-15a-5p	miR-29c-3p	miR-106a-5p	miR-141-3p	miR-221-3p	miR-302c-3p
miR-15b-5p	miR-30b-5p	miR-122-5p	miR-146a-5p	miR-222-3p	miR-155-5p
miR-17-5p	miR-30c-5p	miR-125a-5p	miR-181a-5p	miR-223-3p	RNU 48
miR-24-3p	miR-34c-5p	miR-128	miR-196b-5p	miR-296-3p	

Çizelge 3.2. Panel B miRNA Listesi

let-7f-1-3p	miR-15a-3p	miR-206	miR-146a-3p	miR-106a-3p	miR-30a-5p
miR-30a-3p	miR-155-3p	miR-222-5p	miR-24-1-5p	miR-30c-2-3p	miR-30b-3p
miR-141-5p	miR-17-3p	miR-122-3p	miR-24-2-5p	miR-93-3p	miR-302c-5p
miR-196a-3p	miR-15b-3p	miR-223-5p	miR-29b-1-5p	miR-29a-5p	miR-30c-1-3p
let-7f-2-3p	miR-221-5p	miR-130a-5p	miR-29b-2-5p	miR-29c-5p	miR-181a-2-3p
RNU 48					

## **3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler**

### **3.2.1. Plazma Eldesi İçin Kullanılan Malzemeler**

5 ml'lik % 7.5 EDTA'lı tüp (BD, Vacutainer, İngiltere)

Pipet 20-200 µl (Gilson)

Pipet Ucu 200 µl, Katalog No: DF200 (Gilson)

1.5 ml'lik ependorf tüpleri (DNase, RNase Free)

0.5 ml'lik ependorf tüpleri (DNase, RNase Free)

### **3.2.2. miRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Malzemeler**

High Pure miRNA Isolation Kiti; Katalog no:05 080 576 001 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), İçeriği; Binding Buffer (80 ml), Binding Enhancer (20 ml), Wash Buffer (2x10 ml; her iki yıkama tamponuna 40 ml etanol eklenir), Elution Buffer (30 ml), High Pure Filter

Toplama tüpleri (2x50)

1.5 ml'lik ependorf (DNase, RNase Free)

0.5 ml'lik ependorf (DNase, RNase Free)

Pipet 100-1000 µl (Gilson)

Pipet 20-200 µl (Gilson)

Pipet 10-100 µl (Gilson)

Pipet Ucu 2-30 µl, Katalog No: DF30 (Gilson)

Pipet Ucu 10-100 µl, Katalog No: DF100 (Gilson)

Pipet Ucu 20-200 µl, Katalog No: DF200 (Gilson)

Pipet Ucu 100-1000 µl, Katalog No: DF1000 (Gilson)

### **3.2.3. cDNA Eldesi İçin Kullanılan Malzemeler**

96 Well PCR Plate, Katalog No: 1402-9400 (USA Scientific)

PCR Plate Film, Katalog No: 2921-7800 (USA Scientific)

Pipet 2-20 µl (Gilson)

Pipet 10-100 µl (Gilson)

Pipet Ucu 20- 200 µl, Katalog No: DF200 (Gilson)

Pipet Ucu 2-30 µl, Katalog No: DF30 (Gilson)

Pipet Ucu 1-10 µl, Katalog No: DFL10 (Gilson)

8'li strip tüp

8 kanallı pipet (Gilson)

MegaPlex RT Primers Human, Pool A v2.1, Katalog no: 4444750 (Applied Biosystems)

MegaPlex RT Primers Human Pool B v3.0, Katalog no: 4444750 (Applied Biosystems)

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, 200 Katalog no: 4366596 (Applied Biosystems)

Reverse Transcriptase (ABI)

dNTP Mix with dTTP (100 mM)

10xBuffer (ABI)

RNase Inhibitor

DNase, RNase Free Water

MgCl<sub>2</sub>

### **3.2.4. Pre-amplikasyon Eldesi İçin Kullanılan Malzemeler**

96 Well PCR Plate, Katalog No: 1402-9400 (USA Scientific)

PCR Plate Film, Katalog No: 2921-7800 (USA Scientific)

DNA suspension buffer

8'li strip tüp

8 kanallı pipet (Gilson)

Pipet 2-20 µl (Gilson)

Pipet 10-100 µl (Gilson)

Pipet 100-1000 µl (Gilson)

Pipet Ucu 2-30 µl, Katalog No: DF30 (Gilson)

Pipet Ucu 1-10 µl, Katalog No: DFL10 (Gilson)

Pipet Ucu 10-100 µl, Katalog No: DF100 (Gilson)

Pipet Ucu 100-1000 µl, Katalog No: DF1000 (Gilson)

TaqMan PreAmp Master Mix, 2X Katalog No: 4391128 (Applied Biosystems)

MegaPlex PreAmp Primers (10X), Human Pool A v2.1 Katalog No: 4444750  
(Applied Biosystems)

MegaPlex PreAmp Primers (10X), Human Pool B v3.0 Katalog No: 4444750  
(Applied Biosystems)

### **3.2.5. miRNA Analizi İçin Kullanılan Malzemeler**

Dynamic Array 96x96, Katalog No: BMK-M-96.96 (Fluidigm, Biomark, USA)

Sample&Assay Loading Kit, Katalog No: 85000802 (Fluidigm, Biomark, USA)

DNase, RNase free su

16 kanallı pipet (Gilson)

Pipet Ucu 1-10 µl, Katalog No: DFL10 (Gilson)

### **3.2.6. Kullanılan Cihazlar**

Yüksek Kapasiteli RT-PCR Sistemi, Katalog No: BMK-PKG-MH (Fluidigm, Biomark, USA)

LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied science)

Santrifüj (Sigma k-15-1, Almanya)

-80 °C Soğutucu (ESCO, UUS-668A-1, Singapore)

-20 °C Soğutucu (Arçelik, C123235, Türkiye)

+ 4 °C Soğutucu (Arçelik, C123235, Türkiye)



### **3.3. Yöntemler**

#### **3.3.1. Örneklerin Hazırlanması ve Analiz**

Çalışmaya dahil edilen toplam 64 hasta ve 30 kontrol grubunun plazmaları elde edildi ve bu plazmalardan miRNA izolasyonu yapıldı. Bu aşamaları cDNA eldesi ve pre amplifikasyon aşamaları izledi. Daha sonrasında örnek ve PCR karışımı hazırlandı ve Kantitatif Real-Time cihazına (Fluidigm, Biomark, USA) yüklendi. Bu aşamalarda aşağıdaki protokoller uygulandı.

##### **3.3.1.1. miRNA Analizi İçin Plazma eldesi**

Çalışma gruplarından kan örnekleri 5 ml'lik % 7.5 EDTA' lı tüplere alındı. Kan örneği alındıktan sonra en az 5 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve alınan kan örnekleri oda sıcaklığında 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılarak plazmaları ayrıldı.

1. Tüpler 4000 rpm de 15 dk. santrifüj edildi (santrifüj de fren seçeneği varsa kapatılmalı, santrifüj kendi kendine ve yavaş yavaş durmalıdır).

2. Santrifüj işlemi sonunda tüpler sarsılmadan dikkatlice santrifüjden çıkartıldı, yavaşça ve sarsılmadan kapakları açıldı.

3. Plazmanın en üst kısmından 200 µl lik pipetle 5 kez toplam 1000 µl olacak şekilde toplandı.

4. Toplanan 1000 µl'lik bu örnek 13000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve plazmanın en üst kısmından 200 µl'lik kısım temiz bir eppendorf tüpüne konuldu. Bu işlem, alttaki hücresel kısım rahatsız edilmeden pipet ile (DNase, RNase Free, filtreli pipet uçları kullanılarak) yapıldı. Aynı işlem diğer bir eppendorf tüpü için yapıldı (200 µl'lik 2 örnek).

5. Eppendorf tüpleri üzerine hastaların adları ve verilen numaralar yazıldı.

6. Bu şekilde ayrılan plazma örnekleri -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

### 3.3.1.2. miRNA izolasyonu

miRNA'lar plazmadan miRNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) kullanılarak izole edildi (143).

#### **Protokol:**

1. Plazma örnekleri en az 5 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve 150 µl'lik kısım temiz ependorfa (DNase, RNase Free) alındı.

2. Örnekler üzerine 312 µl Binding Buffer ve 200 µl Binding Enhancer eklendi ve karıştırıldı.

3. Karıştırılan örnekler filtrelili tüp toplama kabına aktarıldı. 13000 g'de 1 dakika sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.

4. Temiz toplama kaplarına alınan filtrelili tüplere 500 µl Wash Buffer eklendi. 13000 g'de 30 sn. sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.

5. Temiz toplama kaplarına alınan filtrelili tüplere 300 µl Wash Buffer eklendi. 13000 g'de önce 30 saniye sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı

6. Temiz toplama kaplarına alınan filtrelili tüpler üzerine herhangi bir şey eklenmeden 1 dakika sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.

7. Filtrelili tüpler temiz ependorfa (DNase, RNase Free) alındı ve 50 µl Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilen örnekler 13000 g'de 1 dakika sanrifüj edildi.

8. Elde edilen total RNA -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

### 3.3.1.3. cDNA eldesi ve Pre- amplifikasyon

İzole edilen miRNA'lar TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, 200 Katalog no: 4366596 (Applied Biosystems) kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü ve analiz gününe kadar -20°C'de saklandı. cDNA eldesi, Pre-amplifikasyon ve amplifikasyon protokolleri üretici firmanın (Fluidigm Co.) önerdiği protokollerle gerçekleştirildi (144

#### miRNA TaqMan cDNA Protokol

1. RNA örnekleri -80°C'den çıkarıldı.
2. Erimeye bırakılan RNA örnekleri 30 sn santrifüj edildi ve daha sonra cDNA protokolü hazırlanana kadar soğuk blok üzerinde bekletildi.

#### 3. Aşağıdaki karışım hazırlandı.

MegaPlex RT Primers (10X) A veya B ** (Sol. 2 veya 3)	60.00 µl
dNTPs with dTTP (100 mM) (Sol. 1-B)	15.30 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL) (Sol. 1-A)	115.00 µl
10X RT Buffer ( Sol. 1-C )	61.30 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) ( Sol. 1-F )	69.00 µl
RNase Inhibitor (20 U/µL) ( Sol. 1-D )	7.60 µl
Nuclease Free Water (Sol. 1-E )	16.80 µl

---

Toplam: 345.00 µl

4. Bir adet temiz 8'li strip tüp (0.2 ml) alındı. Yukarıdaki karışım strip tüpün her bir kuyusuna 42  l olarak pipetlendi.

5. 8 kanallı pipeti 3  l ye ayarlayarak biraz önce hazırlanan karışım 8 li strip tüpten alınarak temiz bir 96 kuyucuklu PCR plate dağıtıldı.

6. Mix'in bulunduğu 96 kuyucuklu Plate alındı. 8 kanallı pipet 2  l ye ayarlanarak RNA  rnekleri cDNA karışımları üzerine pipetlendi. Her pipetlemede 5-6 kez pipetaj yapılarak RNA  rnekleri ile cDNA karışımları karıştırıldı.

7. Plate, yapışkan film ile iyice kapatıldı ve 1 dk. santrifüj edildi.

8. Daha sonra 5 dk. buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.

9. miRNA TaqMan cDNA Thermal Protokolü aşağıda verilen şekilde üstten ısıtma özelliği olan bir thermal cycler'da çalıştırıldı.

\*\*Yukarıdaki protokol primer pool A ve B'nin her ikisi içinde ayrı ayrı uygulandı.

#### **miRNA TaqMan cDNA Termal Program**

16�C	120 sn.	} 40 döngü
42�C	60 sn.	
50�C	1 sn.	

85 C 300 sn.

4 C  

#### **miRNA TaqMan PreAmplifikasyon protokol**

1. cDNA örneklerinin bulunduğu 96 kuyuluk Plate -80 C den çıkarıldı. Eriyen cDNA plate'i 30 sn santrifüj edildi.

2. 8 kanallı pipet 2 µl ye ayarlanarak cDNA örneklerini temiz bir 96 kuyucuklu plate'e aktarıldı. Üzerine 8 µl DNA Suspension Buffer eklendi ve 5-6 kez pipetaj yapılarak karıştırıldı.

3. PCR karışımı 96 örnek için (95 cDNA örneği + 1 Negatif kontrol) aşağıda verilen reaktifler ile hazırlandı (Rakamlara ölü hacimler dahil edilmiştir).

TaqMan PreAmp Master Mix, 2x ( Sol. 8)	287.50 µl
MegaPlex PreAmp Primers (10X) ( Sol. 4 veya 5 )	57.50 µl

---

Toplam: 345.00 µl

4. Bir adet temiz 8'li strip tüp (0.2 ml) alındı. Yukarıdaki karışım strip tüpün her bir kuyusuna 42 µl pipetlendi.

5. 8 kanallı pipet 3 µl ye ayarlanarak biraz önce hazırladığımız 8'li strip tüpten alınan mix temiz bir 96 kuyucuklu plate'e aktarıldı. Pipetleme işlemine 96 kuyunun hepsi doluncaya kadar devam edildi.

6. 8 kanallı pipet 2 µl ye ayarlanarak dilüe edilmiş cDNA örnekleri az önce hazırlanan PCR karışımı üzerine pipetlendi. Her pipetlemede 5-6 kez pipetaj yapılarak karışım ile cDNA örnekleri karıştırıldı.

7. Plate, yapışkan film ile iyice kapatıldı ve 1 dk. santrifüj edildi.

8. Daha sonra 5 dk. buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.

9. miRNA TaqMan PreAmp Thermal Protokolü aşağıda verilen şekilde üstten ısıtma özelliği olan bir thermal cycler'da çalıştırıldı.

### **PreAmp Termal Program**

95°C 600 sn.

55°C 120 sn.

72°C 120 sn.

95°C 15 sn. }  
60°C 240 sn. }

99.9°C 600 sn.

4°C ∞

**10.** PreAmplifikasyon sonunda 2 µl PreAmp cDNA ları temiz bir 96 kuyuluk plate'e aktarıldı. Üzerine 18 µl DNA suspension Buffer koyularak 1:10 olacak şekilde sulandırıldı. Bunun için 8 kanallı 2-50 µl pipeti kullanıldı.

**11.** Eğer PreAmp cDNA lar aynı gün kullanılmayacaksa -80°C de aksi takdirde +4°C de saklandı.

\*\* Bu protokol Pool A ve B preamp primerleri için ayrı ayrı yapıldı.

### **3.3.2. Dynamic Array 96.96'nın Hazırlanması ve miRNA analizi**

cDNA lar Dynamic Array'ler üzerinde 60 miRNA için Yüksek kapasiteli Real-Time PCR sistemi (Fluidigm, Biomark, USA) kullanılarak analiz edildi.

#### **Dynamic Array 96.96'nın Hazırlanması**

Bir adet Dynamic Array 96.96 olarak paketini açıldı. Üst ve alt kısımlarında bulunan küçük hücrelere enjektörler içerisindeki Control Fluid lar yüklendi (her hücreye

1 enjektör). Dynamic Array 96.96'yı IFC Controller'a yerleştirildi ve PRIME edildi. Bu işlem 20 dk. kadar sürmektedir, bu sırada aşağıdaki hazırlık yapıldı.

### **Örnek ve PCR Karışımının Hazırlanması**

1. Aşağıdaki karışım 96 örnek için (94 cDNA örneği+ 2 Negatif kontrol) hazırlandı (aşağıdaki rakamlarda ölü hacimler hesaplanmıştır)

TaqMan Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG)(Sol. 9 )	490.00 µl
GE Sample Loading Reagent (Fluidigm, PN 85000746)	49.00 µl

---

Toplam:539.00 µl

2. Temiz bir 8 li strip tüp alındı (0.2 ml) her bir kuyucuğuna 65 µl yukarıdaki karışımdan pipetlendi

3. Temiz bir 96 kuyuluk plate alındı ve yukardaki karışımdan 3.85 µl her bir kuyucuğa pipetlendi. Daha sonra 8 kanallı pipet ile 3.15 µl dilüe preamplifiye cDNA lar alınarak karışım üzerine pipetlendi. Her pipetlemede 5-6 kez pipetaj yapılarak karışım ile örnekler homojen bir şekilde karıştırıldı.

4. Bütün örnekler bu şekilde pipetlendikten ve karıştırıldıktan sonra Master mix + diluted PreAmplified cDNA'nın her birinden 5 µl alarak dikkatlice Dynamic Array 96.96 da SAMPLE şeklinde işaretli bölüme pipetlendi.

### **ASSAY Karışımının Hazırlanması**

1. Çalışmaya başlamadan önce A ve B Assay plateleri, 30 µl DNase, RNase free su ve Assay Loading Reagent ile 1:1 olacak şekilde çözüldü.
2. Çözülen assaylerden 4.5 µl alınarak Dynamic Array 96.96 da ASSAY şeklinde işaretli bölüme pipetlendi.
3. Assay plate'i aynı gün içinde kullanılacaksa +4°C de aksi takdirde -20°C ye kaldırıldı.
4. Dynamic Array 96.96 IFC Controller'a konularak LOAD programı çalıştırıldı

### **miRNA TaqMan Dynamic Array Protocol**

1. Load ve Mix işlemi bitince BioMark Data Collection software de Start a New Run a tıklandı. Bu arada BioMark üzerindeki ışıkların ikisinde yeşil olmasına dikkat edildi (Lambanın açılmış ve hazır olduğunu gösterir). Dynamic Array 96.96 BioMark'a koyuldu ve Load'a tıklandı.

2. Chip Run File ekranında This is a new chip run a tıklandı. Dosyayı nereye kaydedeceğimiz ve dosyanın isminin ne olacağı seçildi ve Next'e tıklandı.

3. Application, Reference and Probes ekranında Application bölümünde Gene Expressionu, Passive Reference bölümünde ROX a ve Assay bölümünde ise Single Probe a tıklandı ve aşağıda açılan kısımdan FAM - MGB i seçildi ve Next'e tıklandı.

4. Protokol olarak GE 96.96 Standart V1 thermal protokolünü seçildi ve Auto Exposure un seçili olduğundan emin olundu ve Next'e tıklandı.

5. Start Run'a tıklayarak çalışma başlatıldı.



## 4. BULGULAR

Kantitatif Real-time PCR ile çalışılan örnekler Biogazelle qBase PLUS istatistik analiz programı ile değerlendirilmiştir. Değerlendirmede her bir hasta grubu kontrol grubuyla (KHC/Kontrol, Siroz/Kontrol ve HSK/Kontrol) karşılaştırılarak eksprese olan miRNA'lar tespit edilmiştir.

### 4.1. KHC-Kontrol Sonuçlarının Karşılaştırılması

İstatistik analiz sonucunda miR-30a-5p, miR-30c-5p, miR-206 ve miR-302c-5p KHC-Kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırmalarında anlamlı ( $P<0.05$ ) bulunan miRNA'lardır ve KHC'de kontrol grubuna oranla sırasıyla 2.83 kat azalma, 1.5 kat artma, 3.66 kat azalma ve 3.70 kat artma göstermişlerdir. miRNA ekspresyon düzeyleri anlamlılık değerinin üstünde olan ( $P>0.05$ ) ancak eksprese olarak HCV'de kontrole göre artma veya azalma gösteren miRNA'lar ise çizelge 4.1'de gösterilmiştir. KHC-Kontrol grubu karşılaştırmalarında eksprese olmayan miRNA'lar ise çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** KHC-Kontrol grubu eksprese olmayan miRNA'lar

miR-199b-5p	miR-221-5p	miR-196b-5p	miR-125a-5p
miR-146a-3p	miR-34c-5p	miR-24-2-5p	miR-15b-3p
let-7f-2-3p	miR-196a-3p	miR-222-3p	miR-223-5p
miR-222-5p	miR-29b-2-5p	let-7f-1-3p	miR-30b-3p
miR-24-1-5p	miR-15a-5p	miR-15a-3p	miR-181a-2-3p
miR-30c-1-3p	miR-30a-3p	miR-106a-3p	miR-30c-2-3p
miR-29b-1-5p	miR-122-3p	miR-130a-5p	miR-296-5p
miR-29c-5p	miR-141-3p	miR-296-3p	let-7f-5p
miR-141-5p	miR-155-3p	miR-17-3p	miR-29a-5p

**Çizelge 4.2.** KHC-Kontrol grubu eksprese olan miRNA'lar ve P değerleri

miRNA	Karşılaştırma	Mean (KHC/Kontrol)	Ekspresyon Değişimi	P
miR-30a-5p	KHC/Kontrol	0.018/0.051	2.83 kat ↓	0.006159 P<0.05
miR-30c-5p	KHC/Kontrol	0.003/0.002	1.5 kat ↑	0.007034 P<0.05
miR-206	KHC/Kontrol	0.003/0.011	3.66 kat ↓	0.03524 P<0.05
miR-302c-3p	KHC/Kontrol	0.037/0.010	3.70 kat ↑	0.04117 P<0.05
miR-223-3p	KHC/Kontrol	0.013/0.028	2.15 kat ↓	0.05528 P>0.05
miR-181a-5p	KHC/Kontrol	0.231/0.105	2.20 kat ↑	0.05708 P>0.05
miR-130a-3p	KHC/Kontrol	0.037/0.004	9.25 kat ↑	0.6277 P>0.05
miR-15b-5p	KHC/Kontrol	0.225/0.089	2.52 kat ↑	0.06876 P>0.05
miR-29a-3p	KHC/Kontrol	0.677/0.288	2.35 kat ↑	0.1333 P>0.05
miR-29c-3p	KHC/Kontrol	0.001/0.025	25 kat ↓	0.1333 P>0.05
miR-17-5p	KHC/Kontrol	0.019/0.011	1.72 kat ↑	0.1408 P>0.05
miR-155-5p	KHC/Kontrol	0.085/0.347	4.08 kat ↑	0.1667 P>0.05
miR-93-3p	KHC/Kontrol	0.052/0.149	2.86 kat ↓	0.2 P>0.05
miR-93-5p	KHC/Kontrol	0.090/0.068	1.32 kat ↑	0.2067 P>0.05
miR-146a-5p	KHC/Kontrol	0.0003310/0.0004127	0.802 kat ↓	0.2313 P>0.05
miR-221-3p	KHC/Kontrol	0.040/0.032	1.25 kat ↑	0.239 P>0.05

**Çizelge 4.2.** KHC-Kontrol grubu eksprese olan miRNA'lar ve P değerleri (devam)

miRNA	Karşılaştırma	Mean (KHC/Kontrol)	Ekspresyon Değişimi	P
miR-302c-5p	KHC/Kontrol	1.000/0.406	2.463 kat ↑	0.25 P>0.05
miR-30b-5p	KHC/Kontrol	0.187/0.155	1.20 kat ↑	0.3649 P>0.05
miR-24-3p	KHC/Kontrol	0.005/0.003	1.66 kat ↑	0.4462 P>0.05
miR-106a-5p	KHC/Kontrol	0.049/0.041	1.19 kat ↑	0.4727 P>0.05
miR-122-5p	KHC/Kontrol	0.045/0.020	2.25 kat ↑	0.5 P>0.05
miR-128	KHC/Kontrol	0.352/0.444	0.79 kat ↓	0.6 P>0.05

#### 4.2. Siroz-Kontrol Sonuçlarının Karşılaştırılması

İstatistik analiz sonucunda miR-30c-5p, miR-233-3p, miR-302c-3p, miR-17-5p Siroz-kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırmalarında anlamlı ( $P<0.05$ ) bulunan miRNA'lardır ve siroz grubun'da kontrol grubuna oranla sırasıyla 5 kat artma, 14 kat azalma, 5.60 kat artma ve 2.18 kat artma göstermişlerdir. miRNA ekspresyon düzeyleri anlamlılık değerinin üstünde olan ( $P>0.05$ ) ancak eksprese olarak Siroz'da kontrole göre artma veya azalma gösteren miRNA'lar ise çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Siroz-kontrol grubu karşılaştırmalarında eksprese olmayan miRNA'lar ise çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Siroz-Kontrol grubu eksprese olan miRNA'lar ve P değerleri

miRNA	Karşılaştırma	Mean (Kontrol/Siroz)	Ekspresyon değişimi	P
miR-30c-5p	Kontrol/Siroz	0.002/0.010	5 kat ↑	0.00005649 P<0.05
miR-223-3p	Kontrol/Siroz	0.028/0.002	14 kat ↓	0.0005693 P<0.05
miR-302c-3p	Kontrol/Siroz	0.010/0.056	5.60 kat ↑	0.002969 P<0.05
miR-17-5p	Kontrol/Siroz	0.011/0.024	2.18 kat ↑	0.01369 P<0.05
miR-130a-3p	Kontrol/Siroz	0.004/0.113	28.25 kat ↑	0.01587 P<0.05
miR-93-5p	Kontrol/Siroz	0.068/0.151	2.22 kat ↑	0.0176 P<0.05
miR-302c-5p	Kontrol/Siroz	0.406/0.120	3.38 kat ↓	0.02381 P<0.05
miR-128	Kontrol/Siroz	0.444/0.146	3.04 kat ↓	0.09524 P>0.05
miR-30b-5p	Kontrol/Siroz	0.155/0.101	1.53 kat ↓	0.1293 P>0.05
miR-106a-5p	Kontrol/Siroz	0.041/0.079	1.92 kat ↑	0.1583 P>0.05
miR-24-3p	Kontrol/Siroz	0.003/0.002	1.50 kat ↓	0.1795 P>0.05
miR-146a-5p	Kontrol/Siroz	0.0004127/0.0001397	2.95 kat ↓	0.2197 P>0.05
miR-30a-5p	Kontrol/Siroz	0.051/0.037	1.37 kat ↓	0.2412 P>0.05

**Çizelge 4.3.** Siroz-Kontrol grubu eksprese olan miRNA'lar ve P değerleri (devam)

miRNA	Karşılaştırma	Mean (Kontrol/Siroz)	Ekspresyon değişimi	P
miR-29c-3p	Kontrol/Siroz	0.025/0.0002665	93.80 kat ↓	0.25 P>0.05
miR-122-5p	Kontrol/Siroz	0.020/0.047	2.35 kat ↓	0.30 P>0.05
miR-221-3p	Kontrol/Siroz	0.032/0.026	1.23 kat ↓	0.3294 P>0.05
miR-15b-5p	Kontrol/Siroz	0.089/0.033	2.69 kat ↑	0.3333 P>0.05
miR-206	Kontrol/Siroz	0.011/0.012	1.09 kat ↑	0.3485 P>0.05
miR-181a-5p	Kontrol/Siroz	0.105/0.100	1.05 kat ↓	0.4773 P>0.05
miR-222-3p	Kontrol/Siroz	0.355/0.055	6.45 kat ↓	0.5 P>0.05

**Çizelge 4.4.** Siroz/Kontrol grubu eksprese olmayan miRNA'lar

miR-221-5p	miR-106a-3p	miR-199b-5p	miR-30c-1-3p	miR-146a-3p
miR-29b-1-5p	miR-15b-3p	miR-155-3p	let-7f-1-3p	miR-15a-5p
miR-122-3p	miR-125a-5p	miR-24-1-5p	miR-17-3p	
miR-222-5p	miR-29c-5p	miR-223-5p	miR-196b-5p	
let-7f-5p	miR-29b-2-5p	miR-34c-5p	miR-30c-2-3p	
miR-181a-2-3p	miR-30b-3p	miR-130a-5p	miR-29a-5p	
miR-296-3p	miR-155-5p	miR-196a-3p	miR-141-3p	
miR-29a-3p	miR-30a-3p	miR-141-5p	let-7f-2-3p	
miR-15a-3p	miR-93-3p	miR-24-2-5p	miR-296-5p	

### 4.3. HSK-Kontrol Sonuçlarının Karşılaştırılması

İstatistik analiz sonucunda miR-17-5P, miR-233-3p ve miR-24-3p HSK-Kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırmalarında anlamlı ( $P<0.05$ ) bulunan miRNA'lardır ve HSK grubun'da kontrol grubuna oranla sırasıyla 2.18 kat artma, 5.60 kat azalma ve 2.18 kat artma göstermişlerdir. miRNA ekspresyon düzeyleri anlamlılık değerinin üstünde olan ( $P>0.05$ ) ancak eksprese olarak HSK'de kontrole göre artma veya azalma gösteren miRNA'lar ise çizelge 4.5'de gösterilmiştir. HSK/Kontrol grubu karşılaştırmalarında eksprese olmayan miRNA'lar ise çizelge 4.6'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.5.** HSK/Kontrol grubu eksprese olan miRNA'lar ve P değerleri

miRNA	Karşılaştırma	Mean (HSK/Kontrol)	Ekspresyon değişimi	P
miR-17-5p	HSK/Kont.	0.024/0.011	2.18 kat ↑	0.01561 $P<0.05$
miR-223-3p	HSK/Kont.	0.005/0.08	5.60 kat ↓	0.03996 $P<0.05$
miR-24-3p	HSK/Kont.	0.001375/0.003	2.18 kat ↑	0.04731 $P<0.05$
miR-206	HSK/Kont.	0.023/0.011	2.09 kat ↑	0.09608 $P>0.05$
miR-181a-5p	HSK/Kont.	0.306/0.105	2.91 kat ↑	0.1045 $P>0.05$
miR-15b-5p	HSK/Kont.	0.300/0.089	3.37 kat ↑	0.1111 $P>0.05$
miR-221-3p	HSK/Kont.	0.018/0.032	1.77 kat ↓	0.1477 $P>0.05$
miR-302c-3p	HSK/Kont.	0.024/0.010	2.40 kat ↑	0.1793 $P>0.05$
miR-302c-5p	HSK/Kont.	0.173/0.406	2.34 kat ↓	0.2 $P>0.05$

**Çizelge 4.5.** HSK/Kontrol grubu eksprese olan miRNA'lar ve P değerleri (devam)

miRNA	Karşılaştırma	Mean (HSK/Kontrol)	Ekspresyon değişimi	P
miR-30a-5p	HSK/Kont.	0.070/0.051	1.37 kat ↑	0.2176 P>0.05
miR-93-5p	HSK/Kont.	0.134/0.068	1.97 kat ↑	0.2205 P>0.05
miR-106a-5p	HSK/Kont.	0.085/0.045	2.07 kat ↑	0.2231 P>0.05
miR-30b-5p	HSK/Kont.	0.123/0.155	1.26 kat ↑	0.267 P>0.05
miR-30c-5p	HSK/Kont.	0.001718/0.001607	1.06 kat ↑	0.31 P>0.05
miR-146a-5p	HSK/Kont.	0.0001534/0.0004127	2.68 kat ↓	0.3192 P>0.05
miR-29a-3p	HSK/Kont.	0.187/0.288	1.54 kat ↓	0.4 P>0.05
miR-130a-3p	HSK/Kont.	0.0001/0.004	0.04 kat ↓	0.4286 P>0.05
miR-122-5p	HSK/Kont.	0.106/0.020	5.30 kat ↑	0.50 P>0.05

**Çizelge 4.6.** HSK/Kontrol grubu eksprese olmayan miRNA'lar

miR-199b-5p	miR-221-5p	miR-141-3p	miR-93-3p	miR-30c-2-3p
miR-146a-3p	miR-155-5p	miR-155-3p	miR-296-3p	miR-296-5p
let-7f-2-3p	miR-34c-5p	miR-196b-5p	miR-17-3p	let-7f-5p
miR-222-5p	miR-196a-3p	miR-24-2-5p	miR-125a-5p	miR-29a-5p
miR-24-1-5p	miR-29b-2-5p	miR-222-3p	miR-15b-3p	
miR-30c-1-3p	miR-128	let-7f-1-3p	miR-223-5p	
miR-29b-1-5p	miR-15a-5p	miR-15a-3p	miR-30b-3p	
miR-29c-5p	miR-30a-3p	miR-106a-3p	miR-29c-3p	
miR-141-5p	miR-122-3p	miR-130a-5p	miR-181a-2-3p	

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda kronik hepatit C, kronik hepatit C'ye bağlı olarak gelişen siroz ve hepatosellüler karsinomalı toplam 64 hastaya ait plazma örneği ve 30 adet kontrol grubu plazma örneğinde toplam 94 adet miRNA'nın ekspresyon profilleri değerlendirilmiş ve hepatosellüler karsinoma aşamasına henüz gelişmemiş hastalarda hangi miRNA'ların hepatosellüler karsinomanın erken tanısında kullanılabilecek prognostik markırlar olabileceği belirlenmeye çalışılmıştır.

Kronik hepatit C'li plazma örneklerindeki RT-PCR ile çalışılan 60 miRNA'dan miR-30a-5p, miR-30c-5p, miR-206 ve miR-302c-5p ekspresyon düzeylerinin kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılıklar olduğu yapılan istatistik analizler ile belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Bunlardan, miR-30a-5p ekspresyon düzeyinde 2.83 kat azalma, miR-30c-5p ekspresyon düzeyinde 1.5 kat artış, miR-206 ekspresyon düzeyinde 3.66 kat azalma ve miR-302c-5p ekspresyon düzeyinde 3.70 kat artış gösterdikleri belirlenmiştir (çizelge 5.1).

miR-1, miR-30, miR-128, miR-196, miR-296, miR-351, miR-431 ve miR-448 gibi bazı miRNA'ların interferon beta tedavisi ile indüklendiği bildirilmiştir (159). Çalışmamız dahilinde ekspresyon dalgalanmaları gösteren miRNA'lardan olan miR-30a-5p ve miR-30c-5p, miR-30 familyasında yer almaktadır. Büyük olasılıkla bu miRNA'larda tespit edilen bu ekspresyon düzensizlikleri örneklerin alındığı kronik hepatit C hastalarının rutin olarak interferon tedavisi görüyor olmalarından kaynaklanmaktadır.

Ekspresyon düzeyinde 3.66 kat azaltma tesbit etmiş olduğumuz miR-206 ise akciğer kanseri, rhabdomyosarcoma, meme kanseri, endometriyal karsinoma gibi çeşitli kanser tiplerinde ekspresyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (173). HSK ile ilişkilendirilmemiş olmakla birlikte bizim çalışmamızda hem KHC hemde HSK grubunda ekspresyon düzensizlikleri olduğu belirlenmiştir.

KHC grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık bulmuş olduğumuz bir diğer miRNA ise miR-302c-3p'dir. Bu miRNA ile ilgili olarak literatürde kronik hepatit C ile ilişkili bir çalışma bulunmamakla birlikte akut hepatit B'li hastalarda ve kronik hepatit C'ye bağlı olarak gelişen fibroz'lu hastalarda ekspresyonunda artış olduğu



bildirilmiştir (154, 184). Bizim bu karşılaştırmayı yaptığımız hasta grubumuz kronik hepatit C'li hastalardan oluşmaktadır. Bununla birlikte bu miRNA'nın HCV ile ilişkili hepatit tablolarında da artış gösteriyor olması kuvvetli bir olasılıktır ve daha detaylı olarak çalışılması gerekebilir. Ayrıca, miR-302c-3p, sirozlu hasta grubumuzda da kontrole oranla ekspresyon artışı belirlediğimiz bir miRNA'dır.

KHC'li hasta grubunda belirlediğimiz bir diğer ekspresyon değişikliği gösteren miRNA ise miR-223-3p'dir. Bu miRNA'nın HCV ile ilişkili fibroz'da ekspresyonunda artış meydana geldiği bildirilmiştir (154,181). Bununla birlikte HSK'da önemli bir ekspresyon azalması gösterdiği ve HSK'nın erken tanısı için prognostik bir markır olabileceğini ifade eden çalışmalar da yayınlanmıştır (185). Bizim bulgularımıza baktığımızda miR-223'ün her 3 hasta grubumuzda da anlamlı bir şekilde ekspresyon düzeyinde azalma gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgumuz bu miRNA'nın HSK'nın erken tanısı için kullanılacak prognostik bir markır olabileceği fikrini destekler niteliktedir.

KHC'li hasta grubunda kontrol grubuna göre kıyasla anlamlı bir ekspresyon artışı gösteren diğer bir miRNA da miR-181a-5p'dir. Literatüre baktığımızda bu miRNA'nın HCV'ye bağlı olarak gelişen fibroz'da ve HSK'da ekspresyonunda artış belirlendiği bildirilmiştir (154, 186). Bizim bulgularımızda da bu miRNA'nın ekspresyon düzeyi her 3 hasta grubunda artış göstermiş olmakla beraber bu artış istatistiksel olarak yalnızca KHC grubunda anlamlı bulunmuştur. Siroz ve HSK grubundaki sonuçların anlamlı çıkmamasının nedeni örnek ve kontrol gruplarındaki sayısal yeterlilik eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Genel olarak bu bulgumuz da literatür ile uyum göstermektedir.

Siroz-kontrol grubu karşılaştırmasında ise miR-30c-5p en anlamlı ekspresyon artışı gösteren miRNA olarak belirlenmiştir (P=0.00005649). Bu miRNA ekspresyon düzeyinin, daha çok karaciğer rejenerasyonunda artış gösterdiği bildirilmiş olmakla beraber HSK'da metastaz oluşumlarıyla da ilişkilendirilmiştir (154, 185). miR-30c-5p ekspresyon düzeyi her 3 hasta grubumuzda artış göstermiş olmakla beraber, bu ekspresyon artışı istatistiksel olarak KHC ve Siroz grubunda anlamlı bulunmuştur. Siroz grubunda kontrol grubuna göre ekspresyon artışı 5 kat olarak belirlenmiştir. HSK grubunda istatistik anlamlılık düzeyinin üzerinde bir P değeri (P=0.31) bulmuş olmakla beraber, bu grup hastalarda ekspresyon düzeyinde 1.05 katlık bir artış belirlenmiştir.

Anlamli bir iliŒki bulunamamasının nedeni sayısal yetersizlikler olabilir. alıŒmamızda elde ettiğimiz bu bulgu da literatürde bildirilen bulgularla uyum göstermektedir.

Siroz-kontrol grubu karşılaŒtırmamızda belirlediğimiz ekspresyon artışı gösteren diğer bir miRNA miR-223-3p'dir. Bu miRNA ekspresyon düzeyi hasta grubunda kontrol grubuna göre 14 katlık bir azalma göstermektedir. Yukarıda da belirttiğimiz gibi bu miRNA düzeyi her 3 hasta grubumuzda da istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon azalması sergilemekte ve literatürde belirtildiği gibi HSK'nın erken tanısında kullanılabilir bir prognostik markır olabilecek niteliktedir.

Siroz-kontrol grubu karşılaŒtırmamızda anlamlı bir ekspresyon artışı gösteren diğer bir miRNA ise miR-302c-3p'dir. Bu miRNA'nın ekspresyon düzeyi, siroz grubunda, kontrol grubuna göre 5.60 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Literatürde bu miRNA'nın HCV ile iliŒkili fibrozlu hastalarda ekspresyon düzeyinde artış gösterdiği bildirilmiştir (154). Bu mikroRNA'da hasta gruplarımızın her 3'ünde de ekspresyon düzeyi bakımından artış gösteriyor olsa da KHC ve sirozlu hasta gruplarımızda istatistiksel olarak anlamlı, HSK grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bununla beraber bunun nedeni hasta sayısındaki yetersizlik olabilir.

Siroz-kontrol grubu karşılaŒtırmamızda anlamlı bir ekspresyon artışı gösteren diğer bir miRNA ise miR-17-5p olmuŒtur (P=0.01369). Bu miRNA aynı zamanda HSK-kontrol karşılaŒtırmamızda da oldukça anlamlı bir ekspresyon artışı gösteren bir miRNA'dır (P=0.01561). Son yıllarda yapılan bir alıŒmada miR-17-5p'nin hepatosellüler karsinomalı örneklerde normal örneklere göre ekspresyon düzeyinde önemli bir artış gösterdiği bildirilmiş ve bu miRNA'nın HSK tanısı için yeni bir prognostik markır olarak hizmet edebileceği belirtilmiştir (180). Bizim elde ettiğimiz bulgular da bu alıŒmanın bulguları ile uyum göstermektedir.

Siroz-kontrol grubu karşılaŒtırmamızda anlamlı bir ekspresyon artışı gösteren diğer bir miRNA ise miR-130a-3p'dir. Bu miRNA karaciğer rejenerasyonunda ekspresyon artışının bildirilmiş olduğu bir miRNA'dır (154). Bizim alıŒmamızda sadece siroz'lu hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir.

Siroz-kontrol grubu karşılaŒtırmamızda anlamlı bir ekspresyon artışı gösteren diğer bir miRNA'da miR-93-5p olmuŒtur. Bu miRNA'nın ekspresyon düzeyinde fibroz'da artış gösterdiği ve fibrozun erken tanısında kullanılabilir bir biyomarkır olabileceği bildirilmiştir (187). Bizim alıŒmamızda sadece siroz'lu hasta grubunda

oldukça yüksek bir ekspresyon artışı (28.25 kat) gösteriyor olması bulgumuzun, bu çalışma ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Siroz-kontrol grubu karşılaştırmamızda miR-302c-5p'de 3.38 katlık istatistiki olarak anlamlı ( $P=0.02381$ ) bir ekspresyon azalması belirlenmiştir. KHC grubunda bu miRNA ekspresyon düzeyinde artış, HSK grubunda ise azalma belirlenirken bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Literatürde bu bulguyu destekler nitelikte bir bilgiye rastlanmamıştır.

HSK-kontrol grubu karşılaştırmasında birinci sırada istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon artışı belirlediğimiz miRNA miR-17-5p olmuştur. Bu miRNA HSK'lı hasta grubunda kontrol grubu örneklerine göre 2.18 katlık bir ekspresyon artışı göstermiş ve istatistiksel olarak bu artış anlamlı bulunmuştur ( $P=0.01561$ ). Yukarıda da belirttiğimiz gibi miR-17-5p, her 3 hasta grubumuzda da ekspresyon artışı belirlediğimiz miRNA'lardandır. Her ne kadar sadece siroz ve HSK grubu örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunmuş olsa da (siroz-kontrol'de  $P=0.01369$ ; HSK-kontrol'de  $P=0.01561$ ) aslında KHC'li hasta grubunda da kontrole oranla 1.72 katlık bir ekspresyon artışı göstermekte olup P değeri çok yüksek değildir ( $P=0.1408$ ). Bundan dolayı, bu miRNA HSK'nın henüz kanser tablosu ortaya çıkmadan çok önceleri bile erken tanı sağlama potansiyeli olabileceğini düşündürmektedir. Chen ve ark. (180) da yapmış oldukları bir çalışmada, hepatosellüler karsinoma ve parakarsinomatöz karaciğer dokularında miR-17-5p'nin ekspresyon düzeylerini ve hastaların klinopatolojik değişkenleri ile karşılaştırmışlar ve HSK'da ekspresyon düzeyinin normal dokulara göre oldukça artış gösterdiğini, daha da ötesi metastazlılar ile metastazı olmayanlarda da kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmuşlardır. Metastaz'daki bu artışı multiple tümör nodüllerinin varlığı ile ilişkilendirmişlerdir (180). Bu araştırmacılar miR-17-5p'nin HSK'nın tanısında kullanılacak yeni bir prognostic markır olduğunu bildirmişlerdir. Bizim bulgularımız da bu araştırmacıların bulguları ile tamamen uyumlu olup ayrıca bizim çalışmamız miR-17-5p'nin KHC ve siroz aşamasından itibaren HSK'nın erken tanısına önemli katkılar sağlayabilecek nitelikte olduğunu da ortaya çıkartmaktadır.

HSK-kontrol karşılaştırmasında anlamlı bir ekspresyon artışı gösteren diğer bir miRNA'da miR-223-3p'dir. Bu miRNA HSK'lı hasta grubumuzda kontrole oranla 5.60 katlık bir azalma göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P=0.03996$ ). Bu

miRNA, yukarıda da belirttiğimiz üzere her 3 hasta grubunda da ekspresyon değişiklikleri gösteren mikroRNA'lardandır. Bu mikroRNA'nın HCV ile ilişkili fibroz'da ekspresyonunda artış meydana geldiği bildirilmiştir (154, 181). Ancak bizim KHC'li hasta grubumuzda kontrole oranla 2.15 katlık bir ekspresyon azalması belirlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P=0.05528). Bununla birlikte siroz-kontrol karşılaştırmamızda 14 katlık bir ekspresyon azalması ve HSK-kontrol karşılaştırmamızda 5.6 katlık bir ekspresyon azalması göstermektedir. Bu miRNA'nın ekspresyon düzeyinde fibrozda artış, bununla birlikte HSK'da önemli bir ekspresyon azalması gösterdiği ve HSK'nın erken tanısı için prognostik bir markır olabileceğini ifade eden çalışmalar da yayınlanmıştır (154, 184). Bizim bulgularımıza baktığımızda miR-223'ün her 3 hasta grubumuzda da anlamlı bir şekilde ekspresyon düzeyinde azalma gösterdiği belirlenmiştir. Bu miRNA'da daha kronik hepatit C aşamasından itibaren siroz dahil, HSK gelişmeden önce veya HSK aşamasında kullanılabilir prognostik bir markır olabilme potansiyeli ortaya koymaktadır. Bu bulgumuz bu miRNA'nın HSK'nın erken tanısı için kullanılabilir prognostik bir markır olabileceği fikrini destekler niteliktedir.

HSK-kontrol karşılaştırmamızda anlamlı bir ekspresyon artışı gösteren diğer bir miRNA'da miR-24-3p olarak belirlenmiştir. Zhong ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada miR-24 HSK'lı hastalarda 2 kattan fazla bir ekspresyon artışı gösteren miRNA'lar arasında bulunmuştur (182). Diğer bir çalışmada miR-24'ün hepatosellüler karsinoma'nın erken aşamalarında hem tanının konmasına hem de terapötik bir hedef potansiyeline sahip olan önemli bir hedef olduğu bildirilmiştir (183).

Bizim hasta gruplarımızda elde ettiğimiz sonuçları inceleyecek olursak, miR-24-3p KHC grubunda kontrol grubuna göre 1.66 katlık bir ekspresyon artışı göstermekle beraber bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (P=0.4462). Siroz-kontrol grubu karşılaştırmamızda bu miRNA'nın ekspresyon düzeyinde 1.50 kat'lık bir azalma olduğu ancak yine bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (P=0.1795) belirlenmiştir. Diğer taraftan HSK-kontrol grubu karşılaştırmamızda miR-24-3p'nin hasta grubunda kontrol grubuna göre 2.18 kat'lık ve istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon düzeyi artışı belirlenmiştir (P=0.04731). Her ne kadar bu artış, literatür ile uyumlu olsa da, bizim çalışmamızda planladığımız gibi bu miRNA'nın hepatosellüler karsinoma'nın henüz kanser tablosu ortaya çıkmadan erken tanısına hizmet edecek bir potansiyele

sahip olmadığını söyleyebiliriz. Bununla beraber yapılan çalışmalarda bu miRNA'nın hepatosellüler karsinomanın ilk markırlardan birisi olduğu ve hem tanının konmasına hemde terapötik bir hedef potansiyeline sahip olduğu belirtilmektedir (182, 183). Bizim bulgularımız da bu çalışmalarla uyum göstermektedir. Bu nedenlerle miR-24-3p de çalışmamız sonucunda erken bir diyagnostik markır olabileceğini düşündüğümüz bir miRNA'dır.

Her 3 hasta grubunda, diğer birçok miRNA'nın ekspresyon düzeyleri kontrol grubu örnekleri ile karşılaştırıldığında da aslında önemli farklılıklar gösterdikleri görülmektedir. Ancak bu değişiklikler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmadığı için tartışmaya alınmamıştır.

Ayrıca her 3 hasta grubu ve kontrol grubunda bazı miRNA'larda hiç ekspresyon belirlenememiştir. Bunun nedeni, belki gerçekten örneklerin alındığında ekspresyon düzeylerinin çok az olması veya serumda istenen miktarda bulunmaması nedeniyle saptama düzeylerinin düşük olması veya amplifikasyon işlemi sırasında yeterince amplifiye olamamış olmalarından kaynaklanabilir. İleride planlanacak çalışmalarda bu nedenler daha da netleşecektir.

Ancak bizim elde ettiğimiz bulgular her ne kadar özellikle HSK'lı hasta grubumuzdaki örnek sayısı nisbeten az olsa da gerçekten önemli bulgular elde edilebilmesine imkan sağlamıştır.

Sonuç olarak miR-223-3p, miR-17-5p ve miR-24-3p'nin daha KHC aşamasından itibaren HSK henüz ortaya çıkmadan veya erken dönem HSK safhasında noninvaziv olarak yani karaciğer biyopsisi vs. gibi herhangi bir girişimsel işlem uygulanmadan, basitçe kan alımı ve plasma'dan miRNA ekstraksiyonu ile bu hastalığın oldukça spesifik olarak ön tanısının konulmasında kullanılabileceğini bu çalışma ile göstermiş olduk (Çizelge 5.1).

**Çizelge 5.1.** HSK'nın erken tanısında biyomarkır olarak kullanılabilcek miRNA'ların hasta gruplarındaki ekspresyon profilleri

Hasta Grupları	miR-223-3p	miR-17-5p	miR-24-3p
KHC	2.15 kat ↓ (0.05528)	1.72 kat ↑ (0.1408)	1.66 kat ↑ (0.4462)
SİROZ	14 kat ↓ (0.0005693)	2.18 kat ↑ (0.01369)	1.50 kat ↓ (0.1795)
HSK	5.60 kat ↓ (0.03996)	2.18 kat ↑ (0.01561)	2.18 kat ↑ (0.04731)

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genel olarak baktığımızda HCV ile ortaya çıkan klinik tablo bir infeksiyon hastalığı tabiatına sahiptir. Ancak günümüzde HCV, HBV, EBV, HPV, İnsan parvo virüsleri gibi birçok virüs ve *Helicobacter pylori* gibi bazı bakteriler ve hatta bazı protozoonlar ile başlayan çeşitli infeksiyon ve paraziter hastalıklar, ileri dönemlerde kanser tablolarına yol açabilmektedirler. Ayrıca kanser ile ilişkili olabilecek diğer birçok etkenin de kanserlerle olan olası ilişkileri geniş çaplı araştırmalarla devam etmektedir.

Bütün bu gelişmeler mikrobiyolojinin ilgi ve araştırma alanının da genişlemesini zorunlu hale getirmektedir. Yani sadece bu etkenlerin temel biyolojik özellikleri ve infeksiyon oluşturma potansiyelleri ve tanısı değil aynı zamanda bu etkenlerle ortaya çıkabilecek kanser veya immüno-patolojik tabloların takip edilmesi, ön tanısını destekleyecek yaklaşımların geliştirilmesi, etken-konak, etken-immün sistem arasındaki ilişkilerin özellikle moleküler hücre biyolojisi düzeyindeki temel bilgilerle desteklenmesi ve tüm bu bilgilerin biyoinformatik verilerle beslenmesi ve her çalışma verilerinin biyoinformatik veri tabanlarına aktarılarak evrensel veri bankalarına katkıda bulunulması da bu genişleme içerisinde yer almaktadır. Ayrıca günümüzde tanısal teknolojinin kat ettiği gelişmeler çerçevesinde de mikrobiyoloji sınırlarının genişlemesi kaçınılmaz olmuştur.

Yapmış olduğumuz bu çalışma yukarıda belirtilen hemen hemen bütün unsurları içermektedir. Bizim bu çalışmamızda en ileri düzeyde kantitatif analizlerin yapılmasına imkan sağlayan dynamic array-çip teknolojisi kullanılmış ve 2000 yılından sonra tüm araştırma alanları içerisinde geri dönüşümsüz bir şekilde kendini ispatlamış olan miRNA ekspresyon profillemeye analizleri kullanılarak, HCV infeksiyonu ile ortaya çıkan klinik tablo, infeksiyonun prognozu boyunca takip edilerek siroz ve HSK aşamasında da ortaya çıkan miRNA ekspresyon anormallikleri takip edilerek her 3 aşamada da istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların belirlendiği 3 miRNA (miR-223-3p, miR-17-5p ve miR-24-3p)'nın HCV ile ilişkili HSK'nın en erken döneminde, hatta kronik hepatit C aşamasından itibaren tanısına katkı sağlayabilecek potansiyelde prognostik biyomarkırlar olarak kullanılabilceği belirlenmiştir.

Çalışmamız ile elde ettiğimiz bulgular hem ülkemiz hemde evrensel boyutta tüm bilim dünyasına oldukça değerli veriler sunmaktadır. Benzer yaklaşımdaki diğer birçok çalışmanın yapılması hem ülkemizdeki mikrobiyoloji konseptinin gelişmesine hem de diğer birçok mikroorganizma ile kanser tabloları arasındaki ilişkilerin belirlenmesine önemli katkılar sağlayacaktır.

Bu çalışmamızda kullandığımız tüm altyapı imkanları Mersin Üniversitesi. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEITAM) bünyesinde, bir alt yapı projesi ile kurulan, kanserin erken tanısı ileri moleküler tanı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Üniversitemizde yer alan bu ileri teknoloji imkanlarının her araştırmacı tarafından kullanılarak diğer bir çok hastalığın etiyopatolojisinin aydınlatılması ve tanısal biyomarkırlarının araştırılmasının mümkün olduğunu ve buna benzer bir çok araştırmanın yapılması gerektiğini önermekteyiz.



## 7. KAYNAKLAR

1. **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(4902): 359-362.
2. **Avşar E, Eren F.** Hepatit C virus enfeksiyonu. In: Tözün N, Şimsek H, Özkan H, Şimsek İ, Gören A. Eds. *Klinik gastroentoloji ve hepatoloji*. Ankara: MN Medikal-Nobel, **2007**: 419-420.
3. **Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, et al.** Hepatitis C virus detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*, **1994**; 75: 1755-1760.
4. **Maurice R, Greenberg CP.** New insights into HCV replication: potential antiviral targets. *Top Antivir Med*, **2011**; 19(3): 117-120.
5. **Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ.** Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, **1992**; 122(2): 281-288.
6. **Yenen OŞ.** Hepatit C virus. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Eds. *İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, **2002**: 1377.
7. **Barnes E.** Hepatitis C virus. Erişim: [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/viral\\_cancers/en/index2.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index2.html). Erişim tarihi: 16.08.2012
8. **Barut HŞ, Günal Ö.** Dünya ve ülkemizde hepatit C epidemiyolojisi. *Klinik dergisi*, **2009**; 22(2): 38-43.
9. **Alter MJ.** Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, **2007**; 13(17): 2436-2441.
10. **Rehermann B.** Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Semin Liver Dis*, **2000**; 20(2): 127-141.
11. **Şentürk H.** Hepatit C. Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları. In: Göksoy E, Şentürk H. Eds. Sürekli tıp eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi-no:20, İstanbul, **2002**: 79-85.
12. **Marcus EL, Tur-Kaspa R.** Chronic hepatitis C virus infection in older adults. *Clin Infect Dis*, **2005**; 41(1): 1606-1612.
13. **Şentürk H.** HCV enfeksiyonu: Klinik bulgular ve tanı. In: Tekeli E, Balık İ. Eds. *Viral Hepatit 2003*. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayınları, **2003**: 222-225.

- 14.McGivern DR, Lemon SM.** Tumor suppressors, chromosomal instability and hepatitis C virus-associated liver cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, **2009**; 4: 399-415.
- 15.Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, et al.** Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*, **2002**; 122: 366–375.
- 16.Lu W, Lo SY, Chen M, Wu K, Fung YK, Ou JH.** Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology*, **1999**; 264(1): 134–141.
- 17. Demers GW, Foster SA, Halbert CL, Galloway DA.** Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1994**; 91(10): 4382–4386.
- 18.Dong ZZ, Yao M, Yao DF.** Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, **2007**; 6: 241-247.
- 19.Lin LT.** *Host factor regulation of hepatitis C virus replication in rodent cells.* Doctoral thesis, Dalhousie University, Halifax, **2010**.
- 20.Garzon R, Calin GA, Croce CM.** MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*, **2009**; 60: 167-179.
- 21.Gottwein E, Cullen BR.** Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell Host Microbe*, **2008**; 3: 375-387.
- 22.Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P.** Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, **2005**; 309(5740): 1577-1581.
- 23.Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, Landthaler M, Landgraf P, Kan S, Lindenbach BD, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Brownstein MJ, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T, Rice CM.** Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2007**; 104(31): 12884-12889.
- 24.Jopling CL, Schütz S, Sarnow P.** Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe*, **2008**; 4(1): 77-85.
- 25.Croce CM.** Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*, **2009**; 10(10): 704-714.
- 26.Varnholt H, Drebber U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, Odenthal M.** MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **2008**; 47(4): 1223-1232.

- 27. Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, Roberts LR, Schmittgen TD.** Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res*, **2008**; 14(2): 419-427.
- 28. Davis GL, Lau JYN.** Hepatitis C. In: J. Edward Berk, M.D. Eds. *Gastroenterology*, 5th Ed. London, W.B Saunders company, **1995**: 2082.
- 29. Yenen Ş.** C Hepatiti virolojik ve serolojik tanı. In: Kılıçturgay K. Eds. *Viral hepatit '92*, İstanbul: Viral hepatit savaşı derneği, **1992**: 105.
- 30. Purcell RH, Alter HJ, Dienstag JL.** Non-A, Non-B Hepatitis. *Yale J Biol Med*, **1976**; 49: 243-250.
- 31. Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Morit-sugu Y.** Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet*, **1975**; 2(7940): 838-841.
- 32. Houghton M.** Discovery of the hepatitis C virus. *Liver Int*, **2009**; 29(1): 82-88.
- 33. Czepiel J, Biesiada G, Mach T.** Viral Hepatitis C. *Pol Arch Med Wewn*, **2008**; 118(12): 734-739.
- 34. Jopling CL.** Liver-specific microRNA-122 Biogenesis and Function. *RNA Biol*, **2012**; 9(2): 1-6.
- 35. Adanır H, Dinçer D.** Kronik hepatit C enfeksiyonu. In: Yılmaz Ş. Eds. *Her Yönüyle Siroz*. Ankara: Pelikan Kitapevi, **2012**: 63-64.
- 36. Johns Hopkins Medicine Gastroenterology & Hepatology.** Viral hepatitis C.  
Erişim: [http://www.hopkinsgi.org/GDL\\_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL\\_Disease\\_ID=F90D3628-F21C-41B8-873E-FFFD82A8AF4C&GDL\\_DC\\_ID=9AA60584-3607-4D15-BD3F67A3A4A7](http://www.hopkinsgi.org/GDL_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL_Disease_ID=F90D3628-F21C-41B8-873E-FFFD82A8AF4C&GDL_DC_ID=9AA60584-3607-4D15-BD3F67A3A4A7). Erişim tarihi: 15.08.2012.
- 37. Major ME, Feinstone SM.** The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology*, **1997**; 25(6): 1527.
- 38. Wang C, Siddiqui A.** Structure and function of the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Curr Top Microbiol*, **1995**; 203: 99-115.
- 39. Bukh J, Purcell RH, Miller RH.** Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Biochemistry*, **1992**; 89: 4942-4946.
- 40. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, et al.** Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**; 88: 5547-5551.
- 41. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al.** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, **1998**; 282: 938-941.

- 42. Türkoğlu S.** Hepatit C Virus Viroloji ve Seroloji. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. Eds. *Viral Hepatit 2007*. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, **2007**; 4-5.
- 43. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Shimotohno K.** A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun*, **1995**; 215: 744-749.
- 44. Durmaz R.** HCV mutasyonları. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. Eds. *Viral Hepatit 2005*. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını. **2005**; 169-174.
- 45. Bukh J, Purcell RH, Miller RH.** Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1994**; 91: 8239-8243.
- 46. Lerat H, Honda M, Beard MR, Loesch K, Sun J, Yang Y, Okuda M, Gosert R, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM.** Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology*, **2002**; 122: 352-365.
- 47. Goffard A, Callens N, Bartosch B, Wychowski C, Cosset FL, Montpellier C, Dubuisson J.** Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol*, **2005**; 79(13): 8400-8409.
- 48. Polyak SJ, McArdle S, Liu SL, Sullivan DG, Chung M, Hofgartner WT, Carithers RL Jr, McMahon BJ, Mullins JI, Corey L, Gretch DR.** Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J Virol*, **1998**; 72(5): 4288-4296.
- 49. Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T.** Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog*, **2007**; 3: 103.
- 50. Reed KE, Grakoui A, Rice CM.** Hepatitis C virus-encoded NS2-3 protease: cleavage-site mutagenesis and requirements for bimolecular cleavage. *J Virol*, **1995**; 69(7): 4127-4136.
- 51. Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, et al.** Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*, **1996**; 87: 343-355.
- 52. Asabe SI, Tanji Y, Satoh S, Kaneko T, Kimura K, Shimotohno K.** The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J Virol*, **1997**; 71(1): 790-796.
- 53. Tan SL, Katze MG.** How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology*, **2001**; 284: 1-12.
- 54. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R.** Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J*, **1996**; 15(1): 12-22.

- 55. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S.** An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology Journal*, **2011**; 8: 161.
- 56. Abacıoğlu H.** Hpatit C Virusu. In: Ustaçelebi Ş. Eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş kitabevi, **1999**: 881.
- 57. Blight KJ, Norgard EA.** HCV Replicon Systems. In: Tan SL. *Hepatitis C Viruses Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK): Horizon Bioscience, **2006**: 311-315.
- 58. Bartenschlager R, Lohmann V.** Replication of hepatitis C virüs. *J Gen Virol*, **2000**; 81: 1631-1648.
- 59. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R.** Replication of subgenomic hepatitis C virüs RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **1999**; 2: 285(5424): 110-113.
- 60. Helle F, Dubuisson J.** Hepatitis C virüs entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology*, **2006**; 44: 527-535.
- 61. Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L.** Early steps of the hepatitis C virüs life cycle. *Cell Microbiol*, **2008**; 10(4): 821-827.
- 62. Luban J.** Cyclophilin A, TRIM5 and resistance to human immunodeficiency virüs type 1 infection. *J Virol*, **2007**; 81: 1054-1061.
- 63. Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, Wychowski C, Helle F, Pillez A, et al.** The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virüs entry. *PloS One*, **2008**; 3(4): 1866.
- 64. Brass V, Moradpour D, Blum HE.** Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV) :2006 Update. *Int J Med Sci*, **2006**; 3(2): 29-34.
- 65. Fukushi S, Kurihara C, Ishiyama N, Hoshino FB, Oya A, Katayama K.** The Sequence Element of Internal Ribosome Entry Site and a 25 kilodalton Cellular Protein Contribute to Efficient Internal Initiation of Translation of Hepatitis C Virus RNA. *J Virol*, **2007**; 71(2): 1662-1666.
- 66. Neddermann, P., Clementi, A. & 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.
- 67. Egger D, Wolk B, Gosert R, et al.** Expression of hepatitis C virüs proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*, **2002**; 76(2): 5974-5984.
- 68. Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, Blum HE, Bartenschlager R, Moradpour D.** Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem*, **2004**; 279(39): 40835-40843.

- 69. Herker E, Ott M.** Unique ties between Hepatitis C Virus replication and intracellular lipids. *Trend Endocrinol Metab*, **2011**; 22(6): 241-248.
- 70. Popescu C, Dubuisson J.** Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol Cell*, **2009**; 102(1): 63-74.
- 71. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH.** Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**; 88: 3392-3396.
- 72. Bukh J, Purcell RH, Miller RH.** Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1992**; 89: 4942-4946.
- 73. Kanazawa Y, Hayashi N, Mita E, Li T, Hagiwara H, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T.** Influence of viral quasispecies on effectiveness of interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*, **1994**; 20(5): 1121-1130.
- 74. Penin F, Combet C, Germanidis G, Frainais PO, Deleage G, Pawlotsky JM.** Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol*, **2001**; 75(12): 5703-5710.
- 75. Bozdayi AM, Aslan N, Bozdayi G, Türkyilmaz AR, Sengezer T, Wend U, Erkan O, Aydemir F, Zakirhodjaev S, Orucov S, Bozkaya H, Gerlich W, Karayalçin S, Yurdaydin C, Uzunaliimoğlu O.** Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol*, **2004**; 149(11): 2115-2129.
- 76. Simmonds P.** The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol*, **2001**; 82: 693-712.
- 77. Guillou- Guillemette HL, Vallet S, Gaudy-Graffin C, Payan C, Pivert A, Goudeau A, Lunel-Fabiani F.** Genetic diversity of the hepatitis C virus: Impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol*, **2007**; 13(17): 2416-2426.
- 78. Altuglu I, Soylar I, Ozacar T, Erensoy S.** Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. *Int J Infect Dis*, **2008**; 12: 239-244.
- 79. Freeman AJ, Marinos G, Ffrench RA, Llord AR.** Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol*, **2001**; 79: 515-536.
- 80. Mondelli MU, Cerino A, Lisa A, Brambilla S, Segagni L, et al.** Antibody responses to hepatitis C virus hypervariable region 1: evidence for cross-reactivity and immune-mediated sequence variation. *Hepatology*, **1999**; 30(2): 537-545.
- 81. Tarr WA, Urbanowicz RA, Ball JK.** The Role of Humoral Innate Immunity in Hepatitis C Virus Infection. *Viruses*, **2012**; 4: 1-27.

- 82. Boyer N, Marcellin P.** Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol*, **2000**; 32(1): 98-112.
- 83. Gervais A, Bacq A, Bernuau J, Martinot M, Auperin A, Boyer N, et al.** Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C. *J Hepatol*, **2000**; 32(2): 293-299.
- 84. Bonkovski HL, Metha S.** Hepatitis C: a review and update. *J Am Acad Dermatol*, **2001**; 44(2): 159-182.
- 85. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, et al.** Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon- $\alpha$  therapy. *Science*, **1998**; 282: 103-107.
- 86. Bukh J, Miller RH, Purcell RH.** Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis*, **1995**; 15(1): 41-63.
- 87. Farci P.** New insights into the HCV quasispecies and compartmentalization. *Semin Liver Dis*, **2011**; 31(4): 356-374.
- 88. Akıncı E, Bodur H.** HCV enfeksiyonunda klinik ve tanı In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. Eds. *Viral Hepatit 2007*. İstanbul: Viral Hepatit Savaşım Derneği Yayınları, **2007**: 1-3.
- 89. Bağcı S.** HCV İnfeksiyonu Klinik Spectrum- Tanı Kriterleri. Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği 10. Yıl Toplantısı. İstanbul, **2002**: 63-70.
- 90. Seeff LB.** Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*, **2002**; 36(1): 35-46.
- 91. Roberts EA, Yeung L.** Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* **2002**; 36(5): 106-113.
- 92. Kamili S, Krawczynski K, McCaustland KA, Li X, Alter MJ.** The infectivity of hepatitis C virus after drying and storing at room temperature. *Infect Control Hosp Epidemiol*. **2007**; 28(5): 519-524.
- 93. Alter MJ.** Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*, **2002**; 36: 93-98.
- 94.** Global database on blood safety summary report 1998-1999 [Internet]. Geneva: World Health Organization. Erişim: ([http://www.who.int/bloodsafety/global\\_database/en/SumRep\\_English.pdf](http://www.who.int/bloodsafety/global_database/en/SumRep_English.pdf)). Erişim tarihi: 24.08.2012
- 95. Karaca C, Cakaloglu Y, Demir K, et al.** Risk factors for the transmission of hepatitis C virus infection in the Turkish population. *Dig Dis Sci*, **2006**; 51(2): 365-369.

- 96. Mast EE, Hwang LY, Seto DS, et al.** Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J Infect Dis*, **2005**; 192(11): 1880-1889.
- 97. Dinçer D.** Hepatit C epidemiyolojisi ve patogenezisi. *J gastroenterohepatology- Special Topics*, **2010**; 3(1): 77-80.
- 98. Lavanchy D.** The global burden of hepatitis C. *Liver Int*, **2009**; 29(19): 74-81.
- 99. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ.** Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*, **2005**; 5(9): 558-567.
- 100. Ökten A.** Türkiye’de kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma etiyojisi. *Güncel Gastroenterol*, **2003**; 7(3): 187-191.
- 101. Mıstık R.** Ülkemizde Kronik Viral Hepatitlerin Epidemiyolojisi. XIII. Türk Klinik Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Antalya, **2007**: 61-63.
- 102. Mıstık R.** Türkiye’de viral hepatit epidemiyolojisi – Yayınların irdelenmesi. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E, Eds. *Viral Hepatit 2007*. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayınları, **2007**: 10-50.
- 103. Bulut N, Yenişehirli G, Bulut Y.** Tokat İli Kan Donörlerinde Hepatit B, Hepatit C, HIV ve Sifiliz Seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi Yayınları*, **2012**; 18(1): 11-14.
- 104. Barut S, Erkorkmaz U, Yüce S, Üyetürk U.** Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hastanesinde anti-HCV pozitif hastalarda risk faktörlerinin analizi. *Mikrobiyol Bül*, **2008**; 42(4): 675-680.
- 105. J. D. Yang and L. R. Roberts,** “Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma,” *Infect Dis Clin North Am*, **2012**; 24(4): 899–919.
- 106. Jamel A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Word E, Forman D.** Global Cancer Statistic. *CA Cancer J Clin*, **2011**; 61(2): 69-90.
- 107. Raphael SW, Yangde Z, YuXiang C.** Hepatocellular carcinoma: focus on different aspects of management. *ISRN Oncology*, **2012**; 1-12.
- 108. P. Ferenci, M. Fried, D. Labrecque et al.,** “2010 World gastroenterology organization guideline. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective,” *J Gastrointestin Liver Dis*, **2010**; 19(3): 311–317.
- 109. Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB.** The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig. Liver Dis*, **2010**; 42(3): 206-214.



- 110. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, Schraut WW, Schirren CA, Waechter M, Backmund M, Pape GR.** Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology*, **2003**; 125(1): 80-88.
- 111. Hofmann WP, Zeuzem S, Sarrazin C.** Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. *J Clin Virol*, **2005**; 32: 86-91.
- 112. Feld JJ, Hoofnagle JH.** Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, **2005**; 436(7053): 967-972.
- 113. Deutsch M, Hadziyannis SJ.** Old and emerging therapies in chronic hepatitis C: an update. *J Viral Hepat*, **2008**; 15(1): 2-11.
- 114. Dhiman RK, Chawla Y.** Acute viral hepatitis C should be treated. *Indian J Gastroenterol*, **2005**; 24(2): 68-71.
- 115. Jopling CL.** Targeting microRNA-122 to treat hepatitis C virus infection. *Viruses*, **2010**; 2: 1382-1393.
- 116. Jun DW, Tak WY, Bae SH, Lee YJ.** Recent trends in the treatment of chronic hepatitis C. *Korean J Hepatol*, **2012**; 18: 22-28.
- 117. Scott JD, Gretch DR.** Hepatitis C Virus. In: Murray PR. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Ed. Washington: ASM, **2007**: 1437-1444.
- 118. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB.** Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*, **2004**; 1147-1171.
- 119. Grether DR.** Diagnostic tests of for hepatitis C. *Hepatology*, **2004**; 26: 43-47.
- 120. Richter SS.** Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Virol*, **2005**; 34: 115-121.
- 121. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meynaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C.** Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat*, **2001**; 8(2): 87-95.
- 122. Albadalejo J, Alonso R, Antinozzi R, Bogard M, Bourgault AM, Colucci G, Fenner T, Petersen H, Sala E, Vincelette J, Young C.** Multicenter evaluation of the COBAS AMPLICOR HCV assay, an integrated PCR system for rapid detection of hepatitis C virus RNA in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol*, **1998**; 36(4): 862-865.
- 123. Ross RS, Viazov SO, Hoffmann S, Roggendorf M.** Performance characteristics of a transcription-mediated nucleic acid amplification assay for qualitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Lab*, **2001**; 15(6): 308-313.

- 124. Martell M, Gomez J, Esteban JI, Sauleda S, Quer J, Cabot B, Esteban R, Guardia J.** High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol*, **1999**; 37(2): 327-332.
- 125. Majid AM, Gretch DR.** Current and future hepatitis c virus diagnostic testing: problems and advancements. *Microbes Infect*, **2002**; 4(12): 1227-1236.
- 126. Merlo ML, Peper JV, Reid BJ, Maley CC.** Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*, **2006**; 6: 924-935.
- 127. Wong CM, Ng IO.** Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, **2007**: 1478-3223.
- 128. Ergünay K, Ustaçelebi Ş.** Viral onkogenezi ve onkojenik viruslar. In: Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. *Moleküller, Klinik ve Tanısal Viroloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, **2004**: 353-359.
- 129. Aslan G.** Tümör İmmünolojisi. *Turk J Immunol*, **2010**; 15(1): 7-13.
- 130. Dalay N.** Kanser Biyolojisi. In: Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN. *Klinik Onkoloji*. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, **2000**: 48-53.
- 131. Tornesello ML, Buonaguro L, Buonaguro FM.** Advances in viral oncology research: summary of the 3rd International Meeting. 3rd International Conference on Viral Oncology Research. Naples, Italy, **2011**: 411-414.
- 132. Saha A, Kaul R, Murakami M, Robertson ES.** Tumor viruses and cancer biology. *Cancer Biology & Therapy*, **2010**; 10(10): 961-978.
- 133. Hoppe-Seyler F, Hoppe-Seyler K.** Emerging topics in human tumor virology. *Int J Cancer (UICC)*, **2011**; 129: 1289-1299.
- 134. Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, et al.** Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem*, **2000**; 275(44): 34122-34130.
- 135. Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M, Nomura-Takigawa Y, Ikeda M, et al.** NS3 protein of hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J Gen Virol*, **2006**; 87: 1703-1713.
- 136. Kao CF, Chen SY, Chen JY, Wu Lee YH.** Modulation of p53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein. *Oncogene*, **2004**; 23: 2472-2483.
- 137. Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Ray R, 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.

- 138. Cho J, Baek W, Yang S, Chang J, Sung YC, Suh M.** HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta*, **2001**; 1538(1): 59–66.
- 139. Munakata T, Nakamura M, Liang Y, Li K, Lemon SM.** Down-regulation of the retinoblastoma tumor suppressor by the hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2005**; 102(50) :18159–18164.
- 140. Munakata T, Liang Y, Kim S, McGivern DR, Huibregtse JM, et al.** Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS Pathog*, **2007**; 3(9): 1335–1347.
- 141. Jiao W, Datta J, Lin HM, Dundr M, Rane SG.** Nucleocytoplasmic shuttling of the retinoblastoma tumor suppressor protein via Cdk phosphorylation–dependent nuclear export. *J Biol Chem*, **2006**; 281(49): 38098–38108.
- 142. Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, et al.** DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, **2007**; 81(24): 13922–13926.
- 143.** High pure miRNA isolation kit protocol (November 2008). Roche Diagnostics. Erişim: [https://cssportal.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/05080576001\\_en\\_03.pdf](https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/05080576001_en_03.pdf). Erişim tarihi: 27.11.2012
- 144.** MicroRNA Real-Time PCR Using Dynamic Array IFCs. Advanced Development Protocol (PN 100 1616 B2). Fluidigm Co.
- 145. Tamer Gümüş L, Serin MS, Döğen A, Doğruer NZ, Balcı Fidancı Ş ve ark.** Kanserin erken tanısında moleküler altyapı laboratuvarının oluşturulması projesi. In: Tamer Gümüş L, Serin MS Eds. Mersin üniversitesi yayınları, yayın no:30, **2012**:1-84
- 146. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP.** Most mammalian mRNA’s are conserved targets of microRNA’s. *Genome Res*, **2009**; 19: 92-105.
- 147. Elmen J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjarn M et al.** LNA- mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*, **2008**; 452: 896-899.
- 148. Bartel DP.** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **2009**; 136: 215-233.
- 149.** miRBase, release 16. Erişim: <http://www.mirbase.org>. Erişim Tarihi: 22.11.2012.
- 150. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S.** Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, **2009**; 11: 228-234.
- 151. Krützfeldt J, Poy MN, Stoffel M.** Strategies to determine the biological function of microRNAs *Nature Genetics*, **2006**;10:14-19.
- 152. Bartel DP.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **2004**; 116: 281-297.

- 153. Liu D, Fan JJ, Zeng WW, Zhou YY, Ingvarsson SS, Chen HH.** Quantitative analysis of miRNA expression in several developmental stages of human livers. *Hepatol Res*, **2010**; 40: 813-822.
- 154. Lakner AM, Bonkovsky HL, Schrum LW.** microRNAs: Fad or future of liver disease. *World J Gastroenterol*, **2011**; 17(20): 2536-2542.
- 155. Xu J, He JH, Xiao ZD, Zhang QQ, Chen YQ, Zhou H, Qu LH.** Liver-Enriched Transcription Factors Regulate MicroRNA-122 That Targets CUTL1 During Liver Development. *Hepatology*, **2010**; 52: 1431-1442.
- 156. Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ.** Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol*, **2008**; 8: 120-130.
- 157. Lacellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saib A, Voinnet O.** A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cell. *Science*, **2005**; 308: 575-560.
- 158. Zhou Y, Wang X, Liu M, Hu Q, Song L, Ye L, Zhou D, Ho W.** A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages. *Immunology*, **2010**; 131: 40-49.
- 159. Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, David M.** Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature*, **2007**; 449(7164): 919-922.
- 160. Mengshol JA, Golden-Mason L, Rosen HR.** Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, **2007**; 4(11): 622-634.
- 161. Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A.** miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol*, **2008**; 48(4): 648-656.
- 162. Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, Guo H, Fei M, Sun S.** Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem*, **2010**; 56(12): 1830-1838.
- 163. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S.** Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **2009**; 49(4): 1098-1112.
- 164. Liu X, Wang T, Wakita T, Yang W.** Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. *Virology*, **2010**; 398(1): 57-67.
- 165. Scarnolari C, Zingariello P, Vecchiet J, Selvaggi C, Racciatti D, Taliani G, Riva E, Pizzigallo E, Antonelli G.** Differential expression of interferon-induced microRNAs in patients with chronic hepatitis C virus infection treated with pegylated interferon alpha. *Virol J*, **2010**; 7: 311.

- 166. Gramantieri L, Formari F, Callegari E, Sabbioni S, Lanza G, Croce CM, Bolondi L, Negrini M.** MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med*, **2008**; 12: 2189-2204.
- 167. Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM.** miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol*, **2004**; 1(2): 106-113.
- 168. Banaudha K, Kaliszewski M, Korolnek T, Florea L, Yeung ML, Jeang KT, Kumar A.** MicroRNA silencing of tumor suppressor DLC-1 promotes efficient hepatitis C virus replication in primary human hepatocytes. *Hepatology*, **2010**; 53(1): 53-61.
- 169. Jiang X, Tsitsiou E, Herrick SE, Lindsay MA.** MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *FEBS J*, **2010**; 277(9): 2015-2021.
- 170. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, Luedde T.** Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*, **2011**; 53(1): 209-218.
- 171. Mann J, Chu DC, Maxwell A, Oakley F, Zhu NL, Tsukamoto H, Mann DA.** MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology*, **2010**; 138(2): 705-714.
- 172. Mann J, Chu DC, Maxwell A, Oakley F, Zhu NL, Tsukamoto H, Mann DA.** MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology*, **2010**; 138(2): 705-714.
- 173. Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N.** microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: Dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget*, **2012**; 3(1): 9-21.
- 174. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, Giovannini C, Ferrazzi E, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M.** Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, **2007**; 67(13): 6092-6099.
- 175. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Puré E, Agami R.** The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol*, **2008**; 10(2): 202-210.
- 176. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E.** let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, **2007**; 131(6): 1109-1123.
- 177. Ji J, Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Jia HL, Li C, Deng C, Wauthier E, Reid LM, Ye QH, Qin LX, Yang W, Wang HY, Tang ZY, Croce CM, Wang XW.** Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology*, **2009**; 50(2) :472-480.

- 178. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A.** miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2010**; 107(1): 264-269.
- 179. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, Wong N.** MiR-222 Overexpression Confers Cell Migratory Advantages in Hepatocellular Carcinoma through Enhancing AKT Signaling. *Clin Cancer Res*, **2010**; 16: 867-875.
- 180. Chen L, Jiang M, Yuan W, Tang H.** miR-17-5p as a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *J Invest Surg*, **2012**; 25(3): 156-161.
- 181. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D.** Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Molecular Carcinogenesis*, **2011**: 1-7.
- 182. Han ZB, Zhong L, Teng MJ, Fan JW, Tang HM, et al.** Identification of recurrence-related microRNAs in hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Molecular Oncology*, **2012**; 6: 445-457.
- 183. Schwabe RF, Wang TC.** Targeting liver cancer: first steps toward a miRacle?. *Cancer Cell*, **2011**; 20(6): 698-699.
- 184. Zhao WY, Wang DD, Song MQ, Yang L, Ye J, Chen LB.** Role of microRNA-223 and its target gene oncogene c-myc in hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **2011**; 19(2): 114-117.
- 185. Zhao Y, Jia HL, Zhou HJ, Dong QZ, Fu LY, Yan ZW, Sun J, Ren N, Ye QH, Qin LX.** Identification of metastasis-related microRNAs of hepatocellular carcinoma in hepatocellular carcinoma cell lines by quantitative real time PCR. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **2009**; 17(7): 526-530.
- 186. Meng F, Glaser SS, Francis H, DeMarrow S, Han Y, Passarini JD, Stokes A, Cleary JP, Liu X, et al.** Functional analysis of microRNAs in human hepatocellular cancer stem cell. *J Cell Mol Med*, **2012**; 16(1): 160-173.
- 187. Wang G, Kwan BC, Lai FM, Chow KM, Li PK, Szeto CC.** Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: Novel Biomarkers of Fibrosis. *Am J Nephrol*, **2012**; 36(5): 412-418.

## ÖZGEÇMİŞ

13.12.1984 tarihinde Ankara ilinde doğdu. İlkokul eğitimini Ankara'da, ortaokul eğitimini Diyarbakır'da, lise eğitimini Adana'da tamamladıktan sonra 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2006 yılında mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen ve Sosyal Bilimler Enstitüsü Ortaöğretim Alan Öğretmenliği Programında Tezsiz Yüksek Lisansa başladı ve 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.