

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

**SERUM miRNA PROFİLLERİNİN HEPATİT B VİRÜS (HBV)
İNFEKSİYONU VE KRONİK HBV İLE İLİŞKİLİ
HEPATOSELLÜLER KARSİNOMANIN ERKEN
TANISINDAKİ BİYOMARKIR OLMA POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Burcu GÜRER GİRAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ

MERSİN - 2012

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

**SERUM miRNA PROFİLLERİNİN HEPATİT B VİRÜS (HBV)
İNFEKSİYONU VE KRONİK HBV İLE İLİŞKİLİ
HEPATOSELLÜLER KARSİNOMANIN ERKEN
TANISINDAKİ BİYOMARKIR OLMA POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Burcu GÜRER GİRAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ

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

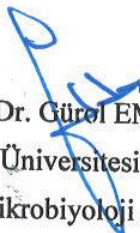
Tez No: 235

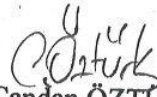
MERSİN – 2012


Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan *“Serum miRNA Profillerinin Hepatit B Virüs (HBV) İnfeksiyonu ve Kronik HBV ile İlişkili Hepatoseüler Karsinomanın Erken Tanısındaki Biyomarkör Olma Potansiyelinin Araştırılması”* başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

21/12/2012


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


Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi


Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 25.12.2012 tarih ve 2012/396 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU



TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitim hayatıma adım attığım andan itibaren mesleki yetenek ve bilgi birikimine hayran olduğum, yetiştirdiği öğrencilerinin her fırsatta zihninin kapılarını ardına kadar aralamasına şevkle izin veren, asla esirgemediği bir emekle akılları ince ince işleyebilen, herşeyden önce insani değerleriyle bizlerin büyümesine, yol kat edebilmesine sonsuz emek harcayarak ışık tutan ve hayat yolumda önder olarak izlediğim bir bilim insanı olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez hocam Sayın Prof.Dr. Gürol EMEKDAŞ'a minnet duygularımı iletmeyi bir borç bilirim.

Bu tezin yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve her konuda bana destek olan Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN başta olmak üzere anabilim dalımızdaki değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU, Sayın Doç. Dr. Feza OTAĞ, Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN'a, Sayın Öğr. Gör. Mahmut ÜLGER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yardımlarını hiç esirgemeyen Mersin Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Orhan SEZGİN ve Mersin Üniversitesi Onkoloji Bilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Ali ARICAN'a teşekkür ederim.

Çalışmamın örnek toplama etabında yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr.Timuçin ÇİL'e teşekkür ederim.

İstatistik analizlerimin oluşturulmasında büyük yardımları olan başta Sayın Prof. Dr. Arzu KANIK olmak üzere tüm Biyoistatistik Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Örnek toplama aşamasındaki katkılarından dolayı özellikle Kan Merkezi biriminin çalışanları olmak üzere, hastanemizin tüm kliniklerine, tez çalışmam boyunca laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm arkadaşlarıma, yaşamın bana gülümseyişler olarak sunduğu yerleri doldurulamaz dostlarıma teşekkür ederim.

Hayatın benim için mükemmel olması adına olmazları oldurtan annem ve babama, onun gibi bir kız kardeşe sahip olmanın ömür çizgimin bana lütfettiği bir şans olan ablama ve birbirimizi bulduğumuz andan itibaren nefes almanın onunla anlamlı olduğunu, yaşamın ne kadar eşsiz ve özel olduğunu varlığıyla bana yaşatan, hayat çabamın destekçisi canım sevgilim, eşim Sait Murat GİRAY'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XII
ÖZET.....	XIV
ABSTRACT	XV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. MikroRNA.....	4
2.1.1. Tarihçe ve Yapısı.....	4
2.1.2. MikroRNA'ların Biyogenezi.....	5
2.1.3. MikroRNA'ların İşlevleri.....	9
2.1.4. MikroRNA Tespit Teknolojileri.....	10
2.1.5. MikroRNA ve Kanser.....	12
2.1.5.1. Tümör Süpresör MikroRNA'lar.....	14
2.1.5.2. Onkogenik MikroRNA'lar.....	15
2.1.5.3. Viral Karsinogenezis ve MikroRNA.....	17
2.2. Onkogenezis.....	17

2.2.1. Viral Karsinogenesizin Genel Özellikleri.....	20
2.2.2. Onkogenlerin Mekanizması.....	20
2.2.2.1. Hücresel Onkogenler.....	20
2.2.2.2. Tümör Süpresör Genler.....	21
2.2.3. DNA Tümör Virüsleri.....	22
2.2.3.1. HBV Onkogenezi.....	22
2.3. Hepatit B Virüsü.....	23
2.3.1. Tarihçe ve Sınıflandırma.....	23
2.3.2. HBV Virüsü ve Genomik Yapısı.....	25
2.3.2.1. Virüsün Yapısı.....	25
2.3.2.2. Virüsün Genomik Yapısı.....	27
2.3.2.3. Virüs Proteinleri.....	28
2.3.2.3.1. Yüzey Proteinleri.....	28
2.3.2.3.2. Kor Proteini.....	28
2.3.2.3.3. X Proteini.....	29
2.3.2.3.4. P Proteini.....	29
2.3.3. HBV Antijen ve Antikorları.....	30
2.3.3.1. HBsAg.....	30
2.3.3.2. Anti-HBs.....	30
2.3.3.3. HBcAg.....	31
2.3.3.4. Anti-HBc.....	31
2.3.3.5. HBeAg.....	32
2.3.3.6. Anti-HBe.....	32

2.3.4. Replikasyon Stratejisi.....	32
2.3.5. Duyarlılık-Dirençlilik.....	36
2.3.6. HBV Subtip ve Genotipleri.....	36
2.3.7. İmmün Kaçış Mekanizmaları.....	39
2.3.8. Hepatit B Virüs Mutantları.....	40
2.3.8.1. S (Yüzey) Mutantları.....	42
2.3.8.2. X Mutantları.....	43
2.3.8.3. Kor ve Prekor Mutantları.....	43
2.3.8.4. Bazal Kor Promotör (BCP) Mutantları.....	44
2.3.8.5. Polimeraz Mutantları.....	45
2.3.9. HBV Epidemiyolojisi.....	45
2.3.9.1. Bulaşma Yolları.....	45
2.3.9.2. Türkiye’ de HBV İnfeksiyonu.....	46
2.3.9.3. Dünya’da HBV İnfeksiyonu.....	48
2.3.10. HBV Patogenezi.....	50
2.3.10.1. Klinik Bulgu ve Belirtiler.....	51
2.3.10.1.1. Akut İnfeksiyon.....	51
2.3.10.1.2. Kronik İnfeksiyon.....	53
2.3.11. HBV ve Hepatosellüler Karsinoma.....	55
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	58
3.1.Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler.....	58
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	58
3.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	58

3.2.2. Kullanılan Malzemeler.....	59
3.2.3. MikroRNA Analizi.....	60
3.2.3.1. Serum Eldesi.....	60
3.2.3.2. MikroRNA İzolasyonu.....	61
3.2.3.2.1. MikroRNA Taqman cDNA Protokolü.....	61
3.2.3.2.2. MikroRNA Taqman PreAmplifikasyon Protokolü.....	63
3.2.3.3. Dynamic Array 96.96'nın Hazırlanması.....	64
3.2.3.3.1. Örnek ve PCR Karışımının Hazırlanması.....	65
3.2.3.3.2. Assay Karışımının Hazırlanması.....	65
3.2.3.3.3. MikroRNA Taqman Dynamic Array Protokolü.....	66
3.3. İstatistiksel Analiz.....	66
4. BULGULAR.....	67
5. TARTIŞMA.....	75
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	84
7. KAYNAKLAR.....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. miRNA sentezi ve olgunlaşma süreci.....	6
Şekil 2.2. miRNA mekanizması.....	8
Şekil 2.3. miRNA'nın biyolojik oluşumu.....	9
Şekil 2.4. miRNA'ların amplifikasyonu.....	13
Şekil 2.5. HBV'nin genom organizasyonu.....	29
Şekil 2.6. Dünya hepatit haritası.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hepatit B vaka ve ölüm sayıları Türkiye 1993-2004.....	46
Çizelge 2.2. Hepatit B morbidite ve mortalite hızları Türkiye 1993-2004.....	47
Çizelge 2.3. Hepatit B vakalarının yaş gruplarına göre dağılımı Türkiye 2004.....	47
Çizelge 2.4. KHB infeksiyon dönemleri.....	54
Çizelge 4.1. Hastaların dağılımı.....	67
Çizelge 4.2. HSK/Kontrol grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması.....	68
Çizelge 4.3. KHB/HSK grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması.....	69
Çizelge 4.4. KHB/Kontrol grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması.....	70
Çizelge 4.5. KHB/KCS grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması.....	71
Çizelge 4.6. KCS/Kontrol grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması.....	72
Çizelge 4.7. HSK/KCS grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması.....	73
Çizelge 4.8. Kontrol, KHB, KCS ve HSK gruplarının hem kontrol grubu hem de birbirleri arasındaki belirli miRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.....	74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

MikroRNA	miRNA, miR
Hepatit B virüsü	HBV
Ground Squirrel Hepatitis Virus	GSHV
Woodchuck Hepatitis Virus	WHV
Avihepadnavirüs	DHBV
messenger RNA	mRNA
pregenomic RNA	pgRNA
Hepatosellüler karsinoma	HSK
Kronik hepatit B	KHB
Kronik lenfositik lösemi	KLL
Karaciğer Sirozu	KCS
Primer transkript mikroRNA	pri-mikroRNA
Prekürsör mikroRNA	pre-mikroRNA
Çevrilmemiş bölge	UTR
RNA indüklenmiş baskılayıcı kompleksi	RISC
Açık okuma çerçevesi	ORF
Polimeraz zincir reaksiyonu	PZR
Kilitlenmiş nükleik asitler	LNZ
Tümör süpresör mikroRNA	TS-miR
Onkogenik mikroRNA	onko-miR

Direkt tekrar	DR
Retinoblastoma	Rb
Sitotoksik T lenfositleri	CTL
Covalently closed circular DNA	cccDNA
National Institutes of Health	NIH

ÖZET

Serum miRNA Profillerinin Hepatit B Virüs (HBV) İnfeksiyonu ve Kronik HBV ile İlişkili Hepatoseüler Karsinomunun Erken Tanısındaki Biyomarker Olma Potansiyelinin Araştırılması

Hücreyel birçok temel işlevin düzenlenmesinde mikroRNA'lar görev almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda mikroRNA'ların hücre içerisindeki seviyelerinin normal koşullar dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Virüsler insanlarda ve hayvanlarda kansere neden olabilmekle birlikte ender olarak tam kanserojendirler. Hepatit B virüsü akut ve kronik karaciğer hastalıklarına sebep olan bir insan patojenidir. Siroz ve karaciğer kanserlerinden dolayı ölümün ağırlık gösterdiği ülkelerde hepatit B virüsünün payı büyüktür. Virüsün sitopatik bir etkisi yoktur. Fakat karaciğer hasarlarına yol açarak hücreleri inflamasyon, apoptozis ve rejenerasyona teşvik eder. Tümörlerin meydana gelişi hücrelerin normal büyüme, üreme, gelişmelerini ve eşzamanlı olarak bu fonksiyonların kontrol ve regülasyonlarını sağlayan proteinlerin kodlandığı genlerde (protoonkogenler ve tümör supresör genler) oluşan genetik düzeydeki değişimler (mutasyonlar) sonucudur. Yakın zamanda elde edilen kanıtlar miRNA'ların tümör supresör ve onkogen olarak görev yapabileceklerini göstermektedir. Karaciğer kanserinin başlıca etiolojisi içinde viral infeksiyon, metabolik anormallikler ve bağışıklığa bağlı düzensizlikler bulunmaktadır. Belirli miRNA genlerinin karaciğer kanseri gelişen dokularda anormal olarak eksprese edildikleri gösterilmiştir. Bu çalışmada Eylül 2011-Ekim 2012 tarihleri arasında kontrol ve tedavi amaçlı başvuran toplam 65 kronik Hepatit B, Hepatit B kökenli siroz ve karaciğer kanseri hastalarının serum örneklerinde, daha önceden belirlenmiş çeşitli mikroRNA türlerinin ekspresyon seviyelerine yüksek kapasiteyi real time PCR yöntemiyle bakılmıştır. Sonuç olarak; sağlıklı kontrol grubu serumları ile KHB, KCS ve HSK hastalarının serum örnekleri, ikili gruplar şeklinde düşünülerek çeşitli miRNA'ların ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla karşılaştırıldı. Karşılaştırmanın sonucunda miR-125b-5p'nin, istikrarlı bir şekilde KHB'den HSK'ya giden yolda ekspresyon seviyesinde artış, miR-223-3p'nin yine KHB'den HSK'ya doğru gelişen süreçte ekspresyon seviyesinde azalma saptandı. HSK'nın tanısında bir erken tanı markırı olarak miR-223-3p ve miR-125b-5p'nin kullanılabilceği fakat bu konu üzerinde daha çok çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: mikroRNA, Hepatit B, Siroz, Karaciğer Kanseri

ABSTRACT

Investigating The Potential of Serum miRNA Profiles As A Biomarker in Early Diagnosis of Hepatitis B Virus (HBV) ' Infection and Chronic HBV Related Hepatocellular Carcinoma

MicroRNAs serve for the regulation of many fundamental cellular functions. In-cell levels of microRNAs that have an outflow out of the normal conditions shown to be associated with the development of cancer in humans with recent studies. While viruses cause cancer in humans and animals they are rarely fully carcinogenic. Hepatitis B virus which cause acute and chronic liver disease is a human pathogenic. The role of hepatitis B virus is great in countries where death due to cirrhosis and liver cancer is dominant. There is no cytopathic effect of the virus. However it promotes cell inflammation, apoptosis and regeneration by leading liver damages. Viruses are generally effective as initiators of neoplastic event and they can perform this feat with different mechanisms. Occurrence of tumors is a result of genetic level variations (mutations) in genes (protooncogenes and tumor suppressor genes) where proteins that provide normal cell growth, reproduction, development and control of these functions simultaneously along with regulation are encoded. Recently obtained evidence shows that miRNAs can act as oncogenes and tumor suppressor miRNAs. Specific miRNA genes are shown to express abnormally in liver cancer developing tissues. In this study, expression levels of several pre-determined microRNA species were investigated with high capacity Real-Time PCR method in the serums obtained from the blood of a total of 65 patients with chronic Hepatitis B, Hepatitis B origin cirrhosis and liver cancer who applied for the control and treatment between September 2011-October 2012. As a result, certain microRNAs tended for the expression levels and compared with each other were in line with other studies around the world and were found to show increase or decrease in the expression levels of cancer, cirrhosis and chronic hepatitis B patients. Consequently, the blood sera of healthy controls were compared with HBV, cirrhosis and HCC patients' blood sera with a consideration in the form of pairs to determine the level of expression of miRNAs. As a result of this comparison, a steady increase in the level of expression in the path from HBV to HSK for miR-125b-5p and a decreased expression level for miR-223-3p in the process evolving from HBV to HCC were established. miR-223-3p and miR-125b-5p can be used as an early diagnostic marker in HSK but more work needs to be undertaken on this subject.

Keywords: microRNA, Hepatitis B, cirrhosis, Liver Cancer

1.GİRİŞ

MikroRNA (miRNA, miR)'lar, hücrel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev almaktadır. Evrimsel olarak birçok miRNA ve ilgili protein düzeneği, solucandan insana kadar geniş bir yelpazede, metazoan organizmalar içerisinde yüksek oranda korunur (1). Bu durum miRNA'ların hem gelişim hem de erişkin vücut döneminde önemli işlemleri yürüttüğünü ima etmektedir (2). İnsan genomunda yüksek seviyede korunmuş, miRNA'ları kodlayan, yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir (3). Bu yeni sınıf gen düzenleyicilerin insanlarda kanser ile ilişkisi daha yeni anlaşılma ile birlikte hücre içerisindeki seviyelerinin normal koşullar dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Hücreler; hem gelişim hem de ergin dönemde koordineli bir şekilde hücre bölünmesi, farklılaşma ve ölümün düzgün olarak gerçekleşmesinden emin olmak için çeşitli yöntemler geliştirmiştir. Hücrelerde farklı durumların kontrollerini üstlenen miRNA'ların ekspresyonları bozulduğunda tümöreneze dahil olmaktadır. Yapılan çalışmalar tümör gelişiminde miRNA'ların tümör süpresörler veya onkogen olarak rol oynadığını açığa çıkarmıştır (2, 4).

Bu güne kadar tespit edilmiş miRNA'ların sadece küçük bir kısmının biyolojik rolleri aydınlatılmıştır. Hedef genlerin ekspresyonunu azaltan olgun miRNA'lar, protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. Kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahip miRNA'lar, baz çiftleşme özelliği ile messenger RNA (mRNA)'ya bağlandıktan sonra protein translasyonunun inhibisyonuna ya da mRNA'nın yıkımına sebep olur (5). Tespit edilen insan miRNA'larının %50'sinin genomda kırılma alan olarak bilinen alanlarda bulunduğu ve kanser ile ilişkilendirildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (6).

MikroRNA'ların, tümör süpresör veya onkogenik özellik kazanmaları, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre değişebilir. Bazı miRNA'ların normal dokulardaki protoonkogen translasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu miRNA'ların fonksiyonu bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmektir ve bu sebeple tümör süpresör miRNA'lar olarak ifade edilmektedirler. Bu tümör baskılayıcı miRNA'ların

ekspresyonunda bir azalma söz konusu olduğunda onkogen ekspresyonu artar ve dolayısıyla bu durum tümör oluşumuna sebep olur. Bu durumun tam tersi olarak ise bazı miRNA'ların bir tümör süpresörün baskılanmasını sağlayarak kanserin gelişimini arttırdığı görülmüş ve bu miRNA'lar onkomir olarak ifade edilmeye başlanmıştır. Tümör süpresör ve onkogen mRNA'ların her ikisi de miRNA'lar tarafından hedef olarak görülebilir. Bu sebeple belirli bir miRNA'nın gerçek işlevi onkogen veya tümör süpresör miRNA'nın hücrel içeriğine bağlıdır (4).

DNA ve RNA tümör virüsleri onkogenleri arasında temel farklılıklar vardır. DNA tümör virüslerinin transforme edici genleri viral replikasyon için gerekli işlevleri kodlarlar ve hücrelerde normal homologları yoktur. DNA virüslerinin transforme edici proteinleri normal hücre proteinleri ile kompleks oluştururlar ve işlevlerini değiştirirler (7).

Hepatit B virüsü (HBV) bir DNA virüsüdür ve akut-kronik karaciğer hastalıklarına sebep olan bir insan patojenidir. Siroz ve karaciğer kanserlerinden dolayı ölümün ağırlık gösterdiği ülkelerde bu ölümlerde hepatit B virüsünün payı büyüktür. Virüsün sitopatik bir etkisi yoktur. Fakat karaciğer hasarlarına, inflamasyona, apoptozis ve rejenerasyona teşvik eder (8). Hepatit B virüsünün onkogenez mekanizması açık değildir. Sürekli viral enfeksiyon, zamanla sirozla sonuçlanan nekroz inflamasyon ve karaciğer rejenerasyonuna yol açar. HBV dünya üzerinde ciddi bir sağlık sorunu oluşturmakla birlikte viral hepatitler arasından en ciddi sorun oluşturanıdır. Dünyada 2 milyar insan (dünya nüfusunun 1/3'ü) HBV ile enfekte olmakla birlikte bu enfekte kişilerin yaklaşık 240 milyonu kronik karaciğer problemi yaşamaktadır (9, 10).

Her yıl ortalama 600.000 (0.5 ile 1.2 milyon) kişi ise HBV'nin meydana getirdiği çeşitli sonuçlarla hayatını kaybetmekle birlikte ölüm oranı temelinde hastalıklar arasında 10uncu sıradadır. Ayrıca karaciğer nakilleri sonucunda oluşan hastalıkların % 5-10'undan da HBV sorumlu tutulmaktadır (9, 11).

Primer karaciğer hücrelerinin malign transformasyonu sonucu gelişen nodüllere veya kütleli hepatosellüler karsinoma (HSK) denir. HSK belirli boyutlara ulaşmadan ortaya çıkmaz. Belirti ve bulgular kendinden çok temelinde yatan kronik karaciğer hastalığına aittir. Virüslerle ilişkili HSK'da hemen her zaman zeminde karaciğer

sirozu (KCS) vardır (12). HSK ve KCS oluşumu HBV infeksiyon varlığında doğal seyirde görülebilir. HBV kronik taşıyıcıları normal bir kimseye oranla HSK gelişimi yönünden daha büyük risk altındadır (13).

Dünya üzerindeki HSK olgularının % 53'ü HBV ile infeksiyon ilişkisi kurulmuştur. HSK gelişim aşamaları, kronik Hepatit B (KHB) hastalarında tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalarda vücudun HBV ile karşılaşması sonucu oluşturduğu karşı immün sistem yanıtının şiddeti, konağın HSK'ya yatkın olması gibi genetik faktörler, HBV replikasyon oranının yüksek olması, HBV genomunda meydana gelen mutasyonlar ile ilişkili olabileceği vurgulanmaktadır (14, 15).

Yüksek yapılı ökaryotlar tarafından kodlanan miRNA'lardan bağımsız olarak insan-patojenik ve viral karsinogenez ile ilişkili bazı virüslerin de miRNA kodladığı gösterilmiştir. Belirli miRNA genlerinin HSK içeren çeşitli karaciğer dokuları için anormal olarak eksprese edildikleri gösterilmiştir (16). Konağa ait birçok miRNA'nın virüsün, virüs miRNA'larının da konağın çeşitli transkripsiyon süreçlerini regüle edebildiği belirtmektedir. Virüs türlerine bağlı olarak eksprese edilen miRNA'lar konağa ait farklı hücre yolakları ile etkileşime geçebilmekte ve özellikle kanser oluşumunun kontrolü sürecinde kritik role sahip çeşitli yolakları etkileyebilmektedir (17).

Bu çalışmada KHB'li, KHB kaynaklı KCS ve HSK hastalarının kanlarından elde edilen serumlarda belirlenmiş bazı miRNA'ların ekspresyon seviyelerine bakılarak, bu miRNA'ların tümör süpresör yada onkogen gibi işlev görüp görmediklerini, dünya verilerine paralel uygunlukta, miRNA'ların HSK'da terapötik olarak kullanılabilme fikrinin girişimleri uygulanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MikroRNA

MikroRNA'lar, hücrel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev almaktadır. Hücre içerisindeki seviyelerinin normal koşullar dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Kanser, hasarlı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve bu duruma devam etmesi sonucu tümör oluşumunun meydana gelmesiyle oluşur. Hücreler; hem gelişim hem de ergin dönemde koordineli bir şekilde hücre bölünmesi, farklılaşma ve ölümün düzgün olarak gerçekleşmesinden emin olmak için çeşitli yöntemler geliştirmiştir. Birçok düzenleyici etken, genleri çoğalma ve farklılaşmada yönlendirmek için açıp kapatmaktadır. Tümör süpresör ve onkojenlerin çoğu ilk önce DNA'dan RNA'ya transkript edilir ve sonra da etkilerini uygulamak için proteine dönüşür. Yakın zamanda elde edilen kanıtlar miRNA olarak isimlendirilen küçük protein kodlamayan moleküllerin tümör süpresör ve onkogen olarak görev yapabileceklerini göstermektedir. Bu yeni sınıf gen düzenleyicilerin insanlarda kanser ile ilişkisi daha yeni anlaşılmaktadır. Hücrelerde farklı durumların kontrollerini üstlenen miRNA'ların ekspresyonları bozulduğunda tümöreneze dahil olmaktadır. Yapılan çalışmalar bu fikri doğrulamakla birlikte, tümör gelişiminde miRNA'ların tümör süpresörler veya onkogen olarak rol oynadığını açığa çıkarmıştır (2, 4).

2.1.1. Tarihçe ve Yapısı

MikroRNA'lar; genom üzerindeki protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden ve protein kodlayan ekzon veya intron bölgelerinden transkripsiyonu sağlanan, ancak proteine translasyonu gerçekleşmeyen, fonksiyon olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan fonksiyonel RNA molekülleridir (1, 5). İnsan genomunda yüksek seviyede korunmuş, miRNA'ları kodlayan, yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir (3).

Hem bitkilerde hem de hayvanlarda gen düzenleyici bir sınıf olan miRNA'lar tek iplikçikli, yaklaşık olarak 18-24 nükleotid uzunluğundadır (2). Primer transkriptler

(pri-miRNA) işlenerek, önce kısa sap-ilmik yapılarına (pre-miRNA), sonra da fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler (Şekil 2.1.). İnsan genomunda %60'ı memeli genlerini hedef alan ve Ağustos 2012 itibariyle, sayısı 1600 adete ulaşan miRNA tanımlanmıştır (18, 19, 20).

İlk miRNA, Lee ve ark. tarafından 1993 yılında keşfedilmiş olup (3), miRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (21, 22). 1993 yılında yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans*'ı gen içeriği bakımından tarayan Lee ve ark., hiçbir protein kodlamayan lin-4 olarak adlandırdıkları genin, 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini bildirmişlerdir. O sıralar bir nematodun yapısal özelliği sanılan ve yaşam döngüsünün zamanlaması ile ilerlemesini kontrol ettiği düşünülen lin-4 keşfedilen ilk miRNA'dır (3, 23, 24). 2000 yılında Reinhart ve ark. (23) *C. elegans*'da, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen 22 nükleotid uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan farklı bir miRNA daha keşfetmişlerdir. İnsanları da içine alan türler arasında let-7'nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olmasından dolayı korunduğu gösterilmiştir (23, 25).

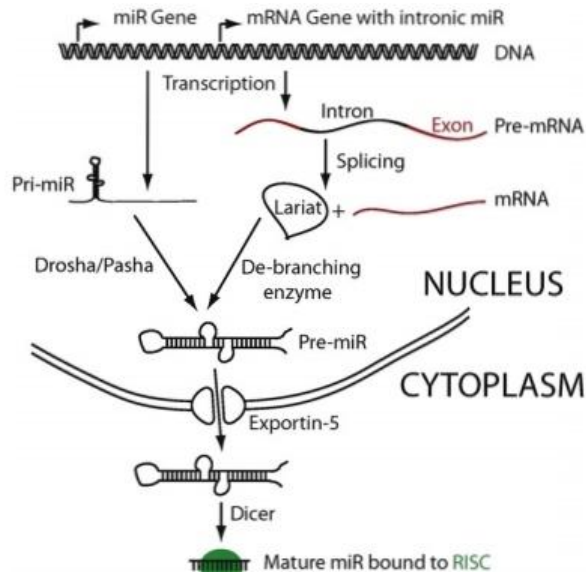
Evrimsel olarak birçok miRNA ve ilgili protein düzeneği, solucandan insana kadar geniş bir yelpazede, metazoan organizmalar içerisinde yüksek oranda korunur (1). Bu durum miRNA'ların hem gelişim hem de erişkin vücut döneminde önemli işlemleri yürüttüğünü ima etmektedir (2). İnsan genomunda yüksek seviyede korunmuş, miRNA'ları kodlayan, yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir (3).

2.1.2. MikroRNA'ların Biyogenezi

MiRNA'lar ya uzun birincil transkript (pri-miR) olarak transkript edilir ya da messenger RNA (mRNA)'ların intronları içinden meydana gelir (Şekil 2.1.) (26). İnsan miRNA'larının çoğu protein kodlayan veya kodlamayan mRNA transkriptlerinin intronları içinde bulunur (27). Geriye kalan miRNA'lar ya genomdaki diğer transkriptlerden uzakta kodlayıcı olmayan mRNA genleri ekzonlarında, mRNA 3'UTR (untranslated region- çevrilmemiş bölgede)'lerinde yer alır ya da 19'uncu kromozom üzerindeki küme dahil diğer miRNA genleri ile birlikte kümelenir (27, 28, 29, 30).

MikroRNA'lar birbirini takip eden üç adımı kapsayan süreç sonucunda oluşur. İlk olarak miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lar nükleus içinde prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara dönüştürülür. Son olarak olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (26).

Olgunlaşmış miRNA'ların aktivitesi mRNA'ların içinde bir hedef sekansının tanınmasına bağlıdır (Şekil 2.2.). Bunlar genellikle 3'UTR bölgesinde bulunur, kısa ve genellikle eksik tamamlayıcıdır. Tipik olarak hedef alanlar miR tohum sekansına (seed sequence) tamamlayıcı 6-7 nükleotid sekansı içerir, ardından poly A kuyruğu gelir. Bu kurallar miRNA hedeflerinin mRNA sekanslarından tahmin edilebilmesini sağlar. Ancak bu tarz tahmin algoritmalarının duyarlılık ve özgüllükleri güvenilir olmayıp her vakada deneysel olarak geçerliliklerinin sağlanması gerekmektedir (29).



Şekil 2.1. miR sentezi ve olgunlaşma süreci (1)

MikroRNA öncülleri (haberciler) genellikle protein kodlayan genler ile aynı şekilde ifade edilir. İlk önce RNA polimeraz II tarafından transkript edilir ve sonra da poly-

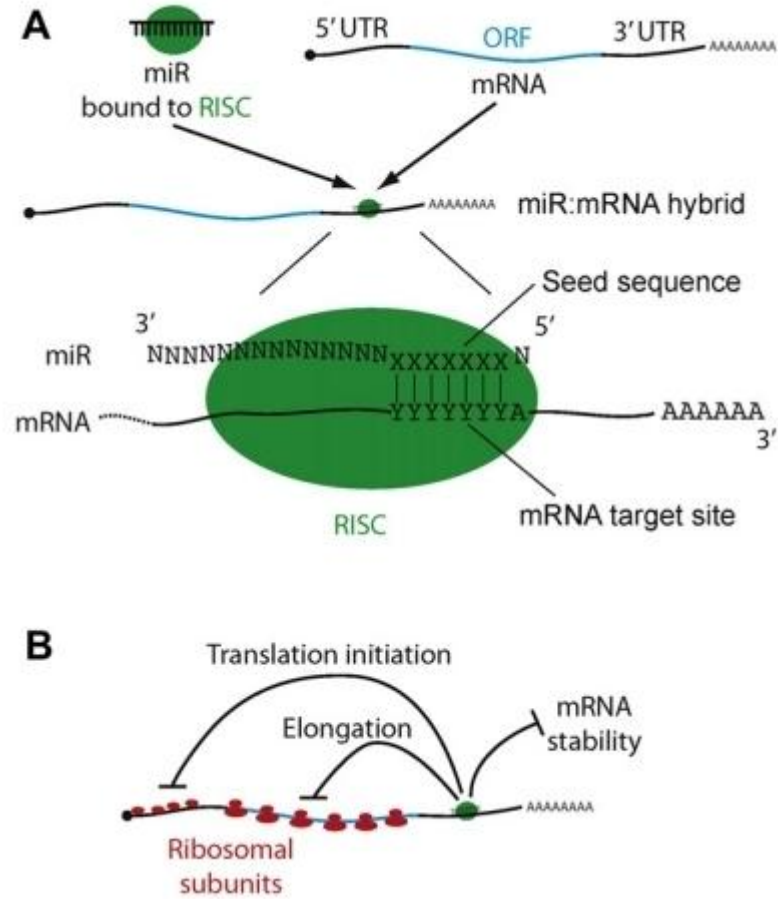
adenil'lenip pri-miRNA oluşturmak üzere kapatılır (29). RNA polimeraz II enzimi tarafından primer transkript olarak genomik DNA'dan sentezlenen pri-miRNA (500-3000 baz), "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahip, sap-ilmik (saç tokası) yapısındadır (Şekil 2.1.) (1). Çekirdekteki pri-miRNA'nın yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülmesi, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından gerçekleştirilir (31).

Çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha ile bir nükleaz olan Drosha'nın oluşturduğu yapı mikro işlemci kompleks (Microprocessor complex) olarak isimlendirilir ve bu kompleks tarafından çekirdekte bölünür. Saç tokası şeklindeki yapının iki kolu arasında ortaya çıkan eksik kendini tamamlayıcı kısa saç tokası şeklindeki döngüler pre-miRNA olarak adlandırılır (2, 32, 33).

Mirton adı verilen bazı miRNA'lar Drosha işlemini pre-miRNA şeklinde birbirine eklenmiş bütün intronları uzatarak atlar (bypass eder) (34). Bir nüklear taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nüklear bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı bir şekilde pre-miRNA molekülü sitoplazmaya taşınır (35, 36). Bunun ardından, sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz tarafından kesilen pre-miRNA'lar, yine Dicer etkisiyle TAR RNA bağlayan protein (TRBP) veya polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aktive eden protein (PACT) ile etkileşimde bulunarak 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA:miRNA dubleksine çevrilir (Şekil 2.3.) (36, 37). Bu esnada Dicer etkisiyle, miRNA: miRNA çiftleri Argonaute1-4 oluşturarak, olgun RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır (38).

Pre-miRNA'nın sap-ilmliği Dicer tarafından kesildikten sonra, RISC kompleksine miRNA:miRNA dubleksinden sadece biri dahil olur. Kusursuz miRNA, mRNA tamamlayıcılığının Argonaute2 tarafından bölünmesine yol açar. Bu da deneysel olarak önemli olmakla birlikte endojen memeli miRNA'larında oluşmadığı düşünülen small interfering RNA (siRNA) yollarıdır. Fakat genellikle bunun yerine eksik mRNA eşleşmeleri dönüşümünün aşağı yönlü regülasyonuna yol açar. Bunun gerçekleştiği mekanizmalar hala çok açık olmayıp bu dönüşümünün başlangıç veya uzatma süresi boyunca etkilendiğini destekleyen modeller vardır (Şekil 2.2) (1). Üçüncü bir olasılık ise

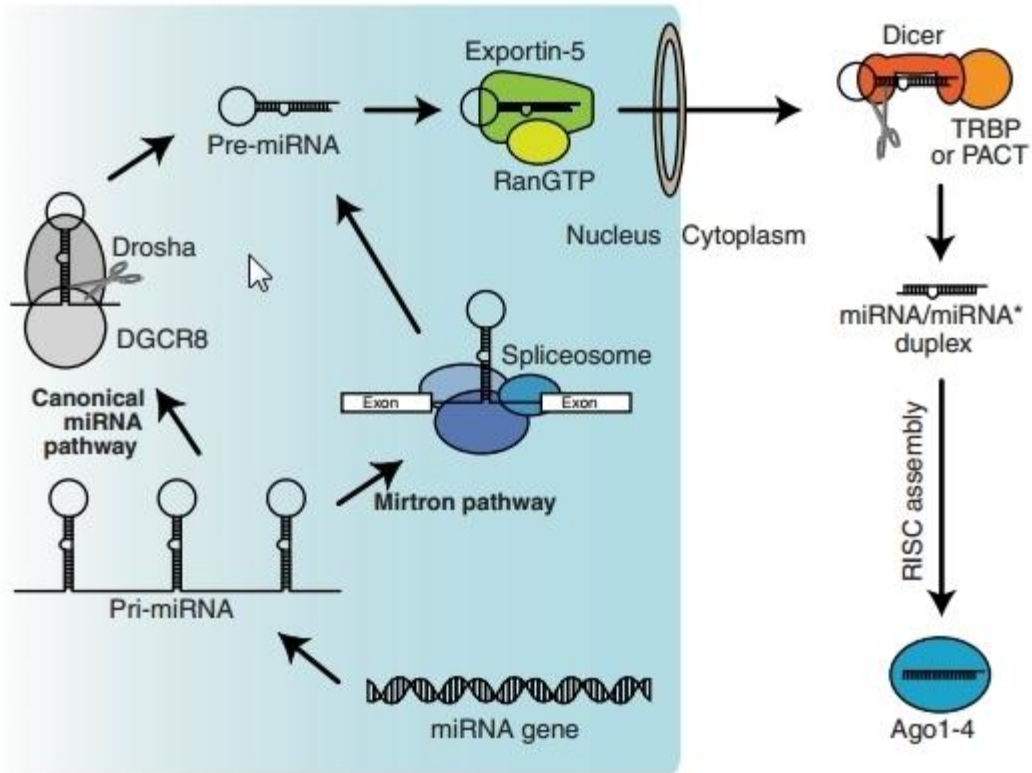
farklı zamanlarda farklı mekanizmaların kullanıldığı en az bir sistemde gözlenen dikkat çekici bir durum olan mRNA sentezini işleyen düzenleyicinin aşağı yönlü regülasyonun hangi aşamada olacağını belirlemesidir (39). Mekanizmanın tam doğası ne olursa olsun etkilenen mRNA'lar granüler sitoplazmik P-body'lerde RISC proteinleri ile beraber toplanır (40).



Şekil 2.2. miRNA mekanizması (1)

Bir RNAz olan ve RISC kompleksinin içinde yer alan Argonaute'ın etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. Bu ipliğe kılavuz iplik (guide strand) adı verilirken diğer iplik de anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır ve sindirilme işlemi RISC kompleksinin substratı olarak gerçekleşir. Aktif RISC

kompleksine entegre olan miRNA'lar bu adımdan sonra, ya Argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (Şekil2.3.) (36, 41).



Şekil 2.3. miRNA'nın Biyolojik Oluşumu (36)

2.1.3. MikroRNA'ların İşlevleri

Bu güne kadar tespit edilmiş miRNA'ların sadece küçük bir kısmının biyolojik rolleri aydınlatılmıştır. Hedef genlerin ekspresyonunu azaltan olgun miRNA'lar, protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. Kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahip miRNA'lar, RISC ile kompleks oluşturup baz çiftleşme

özelliği ile mRNA'ya bağlandıktan sonra protein translasyonunun inhibisyonuna ya da mRNA'nın yıkımına sebep olur (Şekil 2.3.) (5).

MikroRNA, hedef mRNA'nın ORF (open reading frame-açık okuma çerçevesi) bölgesine veya hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanır ve bağlanma pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. 3'UTR bölgesine tam olarak bağlanmayan, kusurlu, eksik komplementerlik gösterir ve translasyonun baskılanması ile sona ererken ORF bölgesi içine bağlanması kusursuz olan tam komplementerliği gösterir ve mRNA'nın Argonaute2 tarafından yıkımı ile sonuçlanır.

Ayrıca, her bir miRNA'nın birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve her bir mRNA'nın da birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir (42).

2.1.4. MikroRNA Tespit Teknolojileri

Belirli organlarda gözlenen ayırıcı miRNA ekspresyon profilleri, miRNA'ların kök hücre ve belirli hücre tiplerinin gelişimi süresince farklılaşmasını yönlendirmedeki önemini belirtmektedir. Günümüzde miRNA ekspresyon seviyeleri kanserleri sınıflandırmada ve elverişli prognozları tahmin edebilecek miRNA markırlarını tanımlamak için kullanılmaktadır (2).

Hücre çeşitlerinin miRNA profillerini belirlemek ve miRNA'ları tespit etmek amacıyla mikrodiziler, boncuk-tabanlı diziler ve nitel gerçek zamanlı PZR gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. MikroRNA mikrodizilerinin prensibi nükleik asitlerin Watson-Crick tabanlı eşleştirilmesidir. Mikrodiziler yüzlerce miRNA'nın eş zamanlı olarak tespitini sağlar. Cam tabakalara (slide) oligonükleotid yakalama uçları konur ve küçük moleküllu RNA'lar için zenginleştirilmiş olan RNA ekstrakt örneğinin yakalama uçları ile hibritlenmesine izin verilir. mRNA'lar kısa olduğuna için uçların dizi içinde erime sıcaklıklarını duyarlılık ve özgülükten ödün vermeden normalize etmek zor olabilir. Bu

problem kilitlenmiş nükleik asitler (LNA) kullanılarak aşılmıştır. Kilitlenmiş nükleik asitler en azından bir adet LNA monomer içerir. Bu monomer, iki adet oksijen atomu ile ribozun dört adet karbon atomunun bağlayıcı bir metilen köprüsü tarafından kilitlenmesi ile oluşan bir nükleik asit dengidir (43). Katılan her bir LNA monomeri nükleik asit dubleks sıcaklığını 2-10°C artırmaktadır. Bundan dolayı, bir yakalama ucuna katılan LNA monomerlerinin sayısını ayarlayarak dizideki bütün uçların sıcaklığı miRNA uzunluğunun kısa olmasına rağmen normalleştirilebilir. Mikrodiziler üzerinde yapılan çalışmalarla birçok hastalığa ait bilgiler keşfedilmiştir. Boncuk tabanlı diziler ayrıca yüzlerce miRNA'nın eş zamanlı olarak ölçülebilmesine izin verir (44).

LNA uçları, 100 adete kadar her bir mikroküreyi (mikrosfer) kendine özgü rengi ile tanımlamak için flow sitometresine izin veren iki floresan boyanın değişken karışımını birleştiren karboksilatlanmış mikrokürelere (mikrosfer) bağlanır. Her bir mikroküre, belirli bir miRNA'ya özgü olan LNA moleküllerine bağlanır ve bu uçlar miRNA ailesi içinde birbiri ile yakın ilişkili olan üyelerin ayırt edilmesine izin verir. Örnekten tüm RNA özütlenir sonra da mikrokürelere ile hibridlenir. Mikrokürelere yıkanır, streptavidin-phycoerythrin ile inkübe edilir ve analiz edilir. Analizör hem floresan mikrokürelere tespit eder hem de streptavidin-phycoerythrin floresanlık şiddetini ölçerken kullanıcıya hangi miRNA'nın örnek içinde bulunduğunu görmesini sağlar. Yapılan test ayrıca bir kalibrasyon eğrisinin sentetik oligonükleotidler gibi uygun bir materyal ile üretilip üretilmediğine ilişkin nicel sonuçları da sağlayabilir. Nicel gerçek zamanlı PZR ayrıca miRNA'ların tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Şekil 2.4.) (45).

Komplementer DNA (cDNA) gerçek zamanlı PZR'da kullanılır. Reverse ve forward primerlerin karışımı ile çift etiketli uç (TaqMan) cDNA hedefini belirlemek ve güçlendirmek için kullanılır. Uç, 5' ucunun son kısmında bir belirteç boyaya, 3' ucunun son kısmında ise bastırıcıya sahiptir. Eğer hedef sıralamaları PZR boyunca var ise uç hedef sıralamasına bağlanır. PZR çevriminin uzatma süresi boyunca belirteç boyası Taq polimerazın ekzonükleaz aktivitesi tarafından salgılanır ve belirteç ile bastırıcılar ayrıldığı için belirteç boyasından floresan tespit edilir. Birincil RNA'lar ve/veya pre-miRNA'lar

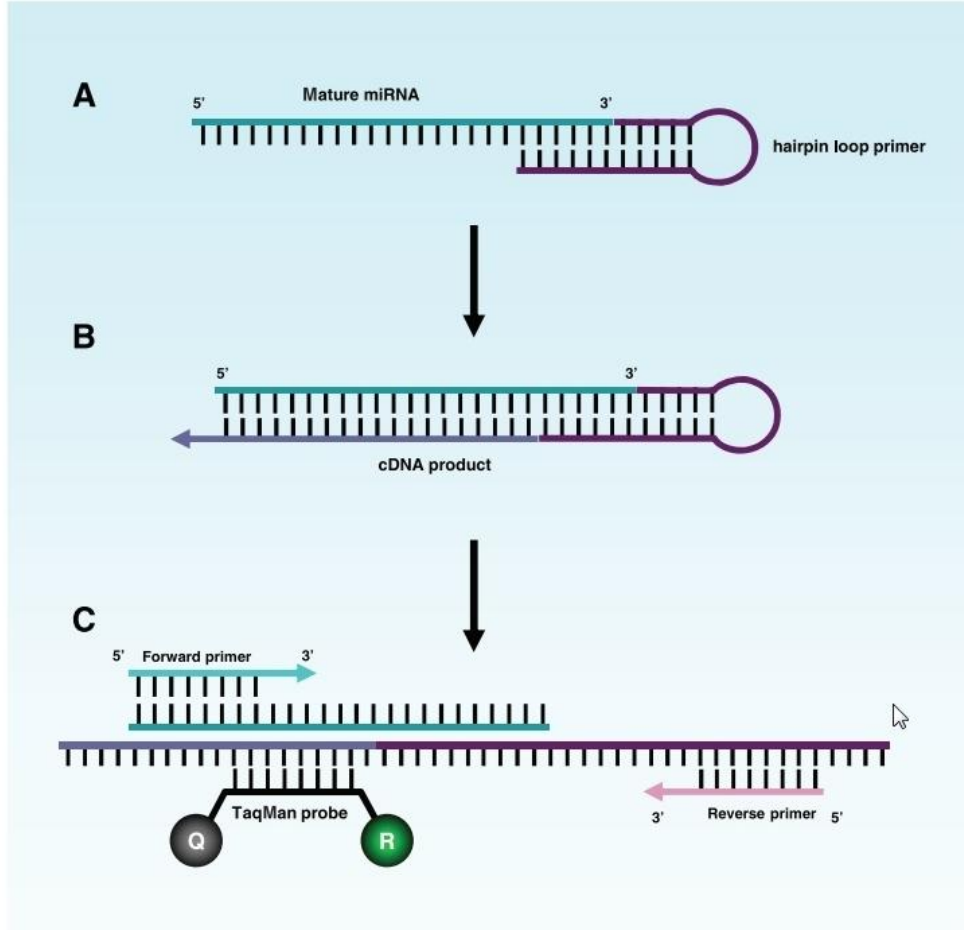
ayrıca aynı yöntemler ile sayılabilir ancak bu tarz testler primer ve uç tasarımlarının ayarlanmasını gerektirir (45).

2.1.5. MikroRNA ve Kanser

Kanserleşme, hücreler anormal olarak çoğalmaya başladığında ve apoptoz fonksiyonlarını kaybettiğinde başlamış demektir. miRNA ekspresyonları çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir. Tespit edilen insan miRNA'larının %50'sinin genomda kırılma alanı olarak bilinen alanlarda bulunduğu ve kanser ile ilişkilendirildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (6).

Kromozom translokasyonları ve noktasal mutasyonları gibi genomik anormallikler pri-miRNA'ların azalması veya artmasına ön ayak olacak şekilde miRNA transkripsiyonunu zayıflatabilir veya canlandırabilir. miRNA genindeki mutasyonlar RISC oluşum anormalliklerine yol açabilir. Tek çekirdekli polimorfizmler veya mutasyonlar ya miRNA'da ya da hedef RNA'da özellikle de çekirdek (seed) bölgesinde yer aldığı zaman düzgün hedef tanımlanmasını geçersiz kılabilir. Sonuç olarak genler RISC tarafından düzenlenmekten kaçınabilir ve hatta hatalı hedefleme sonucunda farklı bir şekilde düzenlenmiş olabilirler. Genomik anormallikler ayrıca anormal miRNA işlenmesi ile de sonuçlanabilir. Bazı pri-miRNA'lar etkili dönüşüm için ek proteinlere ihtiyaç duyarlar. Sitoplazmada, TAR RNA-bağlayıcı protein (TRBP) MAPK/Erk sinyali ile fosforillenir. TRBP fosforilasyonu, genel miRNA'larda, pre-miRNA'dan miRNA/miRNA'ya dönüşümü artırır ancak let-7 ailesi miRNA'larda dönüşümü azaltır (26).

miRNA'ların kanser ile ilişkilendirilmesine ilk kanıt olarak 2002 yılında Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarda Calin ve ark. (46) yaptıkları moleküler çalışma gösterilebilir. Bu çalışmada kanserleşme sürecine miRNA'ların katkıda bulunduğunu ortaya koyulmuştur. Kanseri ve normal doku arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, miRNA'ların kanser patogeneziindeki rollerini güçlendirmiştir (46).



Şekil 2.4. miRNA'ların amplifikasyonu (47)

MikroRNA genlerinin genellikle, amplifikasyonun minimal olduğu veya genel kromozomal kırılma noktası bölgeleri olan heterozigotinin kaybolduğu alanlarda kırılan kısımlara yerleşik olduğu gösterilmiştir (48).

İlk olarak insanda, normal dokular ile katı tümörler (kolonik ve rektal adenokarsinomlar) karşılaştırıldığında ekspresyon seviyelerinde değişiklik olan miRNA'ları 2003 yılında Michael ve ark. bildirmişlerdir (49). Bu çalışmanın ardından değişmiş miRNA seviyeleri HSK'da (16), Burkitt's lenfomada (50), malign beyin tümörlerinde (51), tiroid kanserinde (52), akciğer kanserinde (53) ve meme kanserinde (1) tespit edilmiştir. 2004 yılında yine Calin ve ark. (6), 186 adet miRNA geninin DNA

üzerindeki pozisyonunu, insanlardaki miRNA genlerinin kanser ile ilişkisini araştırmak için haritalandırmışlardır (6).

miRNA'ların, tümör süpresör veya onkogenik özellik kazanmaları, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre değişebilir. Bazı miRNA'ların normal dokulardaki protoonkogen translasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu miRNA'ların fonksiyonu bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmektir ve bu sebeple tümör süpresör miRNA'lar (TS-mir) olarak ifade edilmektedirler. Bu tümör süpresör miRNA'ların ekspresyonunda bir azalma söz konusu olduğunda onkogen ekspresyonu artar ve dolayısıyla bu durum tümör oluşumuna sebep olur. Bu durumun tam tersi olarak ise bazı miRNA'ların bir tümör süpresörün baskılanmasını sağlayarak kanserin gelişimini arttırdığı görülmüş ve bu miRNA'lar onko-mir olarak ifade edilmeye başlanmıştır. Tümör süpresör ve onkogen mRNA'ların her ikisi de miRNA'lar tarafından hedef olarak görülebilir. Bu sebeple belirli bir miRNA'nın gerçek işlevi onko-mir veya TS-mir'in hücrel içeriğine bağlıdır (4).

2.1.5.1. Tümör Süpresör MikroRNA'lar

İlk olarak 2001 yılında, miR-15a ve miR16-1'in keşfi ile miRNA'ların kanserleşme sürecine etkisi bildirilmiş (46) ve 2005 yılında Cimmino ve ark. yaptıkları çalışma sonucu bu miRNA'ların etki mekanizması ortaya konulmuştur (54).

Çalışmada, KLL hücrelerinde bu iki miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin, anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteini olan Bcl-2'nin üretimi ile ters ilişkili olduğu yani miR-15a ve miR16-1'in tümör süpresör aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. miR-15a ve miR16-1'in düşük seviyelerinin (tümör süpresör fonksiyon kaybı) yüksek seviyede Bcl-2 proteini ile ilişkili olduğu bunun sonucu olarak ise anormal hücre büyümesine sebep olan yüksek seviyelerinin (normal tümör süpresör aktivite) ise apoptoz ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Çalışmanın sonucunda miR-15a ve miR16-1'in normal seviyelerinin,

kontROLSÜZ hücre büyümesini engelleyerek tümör süpresör aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (54).

Let-7 ailesinin üyeleri (let-7b, let-7c, let-7d, let-7f ve let-7g) tümör süpresör özellik gösteren diğer bir miRNA'dır (53). Normal akciğer dokusu ile akciğer kanserli hastaların akciğer dokusu karşılaştırıldığında genellikle düşük let-7 seviyeleri gözlenmiştir. Akciğer kanseri hücre kültürü modelinde let-7 seviyesi normal bir akciğer dokusundaki seviyesine oranla artırıldığında kanser hücrelerindeki büyüme oranının azaldığı gözlenmiştir (53, 54, 55).

2.1.5.2. Onkogenik MikroRNA'lar

Kanser türlerinde kontROLSÜZ büyüme arttırıcı ya da anti-apoptotik yönde fonksiyon gösteren onkogenik miRNA'lar tümör süpresör miRNA'ların tersine işlev görürler. Onkogenik miRNA'ların ilk keşfedileni miR-155'tir. Hedef mRNA'sı tam olarak belirlenememiş olan miR-155'in, ekspresyonunun tavukta lösemi ve lenfoma oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (56).

miR-21, onkogen gibi işlev gösteren diğer bir miRNA'dır. Glioblastoma (57), akut myeloid lösemi (58), KLL (59) gibi hematolojik maligniteli hastalarda ve katı tümörlerde, mide, kolon, pankreas, akciğer, prostat, meme ve karaciğer kanseri gibi birçok kanser türünde ekspresyonu yüksek seviyede gözlenmiştir (60, 61).

Basit heliks-döngü-heliks transkripsiyon etkenini kodlayan myc onkogeni insan kanserlerinde genellikle mutasyon geçirmiş veya amplifiye olmuştur, hem hücre çoğalması hem de apoptozu tetikleyebilme kabiliyeti sayesinde hücre büyümesinin önemli bir faktörü olduğu gösterilmiştir (62).

miRNA'lar ile myc'nin artan ekspresyonu arasında yakın bir ilişki olduğu görülmektedir (2). İnsan genomunda kromozomun 13q313 yerleşik olan miR-17-92 gen kümesi, altı adet miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1) kodlamaktadır ve onkogenik olduğu gösterilen ilk miRNA'yı kodlayan bir bölgedir.

Transgenik farelerde c-myc onkogeninin fazla ekspresyonunun gerçekleştiği miR17-19 gen kümesinin, yüksek seviyede ekspresyonuna neden olarak B hücreli lenfomanın gelişimini ilerlettiği belirtilmiştir (63).

HSK, A.B.D.'nde kansere bağlı erkek ölümü sebeplerinde 5'inci sırada yer almakta olup yıllık yaklaşık olarak 21.000 yeni vaka (erkek ve kadın) teşhis edilmektedir (64). Karaciğer neoplazması klinik olarak heterojen olup risk faktörleri ve genetik değişiklikler ile ilişkilendirilmektedir (16). HSK'nın başlıca etiyojisi içinde viral infeksiyon, metabolik anormallikler ve bağışıklığa bağlı düzensizlikler bulunmaktadır (65).

Belirli miRNA genlerinin HSK içeren çeşitli karaciğer dokuları için anormal olarak eksprese edildikleri gösterilmiştir. Murakami ve arkadaşları, HSK'daki miRNA gen ekspresyonunu profilemek için mikrodizi teknolojilerini ilk kullanan kişilerdir. Bu çalışmada, miR-224, miR-18 ve pre-miR-p18 geni HSK örneklerinin tümör olmayan dokulardan daha yüksek ekspresyon sergilediği görülmüştür. miR-199a, miR-200a, miR-125a, miR-195 ise HSK örneklerinin bitişik tümör olmayan doku örneklerine kıyasla daha az eksprese olduğu gösterilmiştir (16).

Daha yakın zamanda yapılan bir çalışmada Ladeiro ve ark. kötü huylu hepatosellüler tümörler ile iyi huylu olanları ayırtmak için miRNA profillemesinin kullanılabileceğini göstermiştir (66). Bu çalışma aynı zamanda çeşitli tümör alt gruplarındaki miRNA'ları onkojen varlığı, tümör bastırıcı gen mutasyonu ve belirli risk faktörleri temelinde karakterize etmiştir. Hem iyi huylu hem de kötü huylu hepatosellüler tümörlerinde miR-224 ekspresyonu artarken, miR-122a ve miR-422b'nin ekspresyonlarında ise azalma sergilendiği belirtilmiştir. Li ve ark. kanserli karaciğer dokularını kanser olmayanlardan ayıran 69 miRNA profilini tanımlamıştır (67). Bu miRNA'ların sekiz tanesi daha sonra iyi ve kötü huylu karaciğer tümörleri ile sağlıklı karaciğer dokusunun ayırt edilmesinde doğrulama amacıyla kullanılmak üzere seçilmiştir. miR-125b'nin HCC'de ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. MiR-125b'nin fazla ekspresyonu HCC hastalarında yüksek oranda hayatta kalma ile ilişkilendirilmiştir. Jiang ve arkadaşları HCC hastalarında 19 tane miRNA'nın azalan ve artan ekspresyonlarının hastaların hayatta kalma ile ilgili genini tespit etmiştir (68).

Li ve ark. miR-125b faaliyet mekanizmasının fosforilasyonu baskılayarak hücre inhibisyonu ve dolayısıyla da Akt'nin etkisizleştirilmesine (inaktivasyon) dahil olduğunu göstermiştir (67). Fornari ve ark. miR-221'in HSK'da ekspresyon seviyesinin arttığını ve potansiyel bir onkojenik işlevini belirlemiştir (69).

2.1.5.3. Viral Karsinogenezis ve MikroRNA

Yüksek yapılı ökaryotlar tarafından kodlanan miRNA'lardan bağımsız olarak insan-patojenik ve viral karsinogenez ile ilişkili bazı virüslerin de miRNA kodladığı gösterilmiştir. Virüslerin kodladığı bilinen miRNA sayısı türden türe değişiklik göstermektedir. Viral miRNA'ların virüs gen ekspresyonlarının otoregülasyonu, konağın immün sisteminden kaçış mekanizmalarının kontrolü ve latent/persistent infeksiyonların oluşmasını sağlamaktadır. Buna bağlı olarak konağa ait birçok miRNA'nın virüsün, virüs miRNA'larının da konağın çeşitli transkripsiyon süreçlerini regüle edebildiği belirtilmektedir. Virüs türlerine bağlı olarak eksprese edilen miRNA'lar konağa ait farklı hücre yolları ile etkileşime geçebilmekte ve özellikle kanser oluşumunun kontrolü sürecinde kritik role sahip çeşitli yolları etkileyebilmektedir (17).

2.2. Onkogenezis

Sağlıklı normal bir hücrenin premalign potansiyele sahip hücre şekline dönüşmesi olayı onkogenezis olarak ifade edilir. Bu dönüşüm hücrenin bağımsız çoğalabilme kabiliyeti ile karakterizedir ve bu dönüşümde hücrenin sinyalini, büyümesini, hayatta kalmasını, hareket kabiliyetini, anjiogenezisini ve hücre döngüsü kontrolünü regüle eden moleküllerin salgılanması ile fonksiyonu gibi bir dizi genetik ve epigenetik (gen değişikliği olmaksızın) değişiklikler yer alır (70).

Karsinogenez çok basamaklı bir olaydır. Yani normal hücrenin malign hücreye dönmesi için çok sayıda genetik değişiklik olması gerekir. Ara dönemler tanımlanarak immortalizasyon, hiperplazi ve preneoplastik şeklinde isimlendirilmiştir. Karsinogenezde,

tümör virüslerinin genellikle kofaktör olarak etkili olduğu görülmektedir ve sadece malign hücrelerin gelişmesi için gerekli bazı basamakları sağlarlar (71).

Virüsler genellikle neoplastik olayın başlatıcıları olarak etkili olurlar ve bunu farklı mekanizmalarla yapabilirler. Viral nedenli tümörlerin gelişmesi için virüsler gereklidir fakat yeterli değildir. Tümörlerin meydana gelişi hücrelerin normal büyüme, üreme, gelişmelerini ve eşzamanlı olarak bu fonksiyonların kontrol ve regülasyonlarını sağlayan proteinlerin kodlandığı genlerde oluşan genetik düzeydeki değişmeler (mutasyonlar) sonucudur. Bu varyasyonlar, protoonkogenlerin aşırı aktivasyonuna ve bunun sonucu olarak da yol açarak bu önemli ve normal genlerin, sellüler onkogenler haline dönüşümüne ve sonucunda da hücrelerin üremelerini stimüle eden fazla sayıda onkoprotein sentezine yol açarak kontrolü olmayan ve sonuç olarak da süregen ve sınırsız hücre üremelerine yani tümör formasyonuna sebep olurlar ve hücre döngüsünün kontrolü bozulmuş olur (72).

Tümör süpresör genler ve protoonkogenler (antionkogenler), bir kaç koşulun birlikte ve paralel etkisiyle mutasyonlara maruz kalarak tümör oluşumuna yol açarlar. Bu nedenle de tümörlerin oluşumu uzun bir süreç içerisinde gerçekleşir (72). Tümör baskılayıcı genler hücrelerin korunmasını sağlar. Büyümenin kontrolünde kontrol noktası görevi yapan P16 geni bu genlerin en önemlilerinden birisidir. Diğer bir önemli tümör baskılayıcı gen olan P53 ise malignant hücreleri apoptozis yoluyla imha eder (70).

Yapılan çalışmalar, RNA tümör virüslerinin neoplazide hücrel onkojenlerin katılımını ortaya koyarken DNA tümör virüsleri hücrel tümör baskılayıcı genlerin rolünü ortaya koymuştur. Tümör virüsleri diğer virüsler gibi genomlarının nükleik asidine ve viriyonların biyofiziksel özelliklerine göre farklı virüs ailelerinde sınıflandırılır. Bilinen tümör virüslerinin çoğunluğunun DNA genomu vardır veya HCV virüsü hariç olmak üzere hücreleri infekte ettikten sonra DNA provirüs ortaya çıkarırlar. DNA tümör virüsleri viral replikasyonda önemli olan ve hücrel büyüme kontrol yollarını da etkileyen viral onko-proteinleri kodlarlar. RNA tümör virüslerinin çoğunluğu retrovirüs ailesinde bulunur. Retrovirüsler, virüsün RNA genomundan DNA kopyası oluşturan RNA'ya yönelimli polimeraz (ters transkriptaz; revers transkriptaz) enzimi kodlarlar. DNA kopyası (provirüs) enfekte konak hücrenin DNA'sına entegre olur ve bu entegre DNA'dan virüsün bütün

proteinleri kodlanır. Hücre davranışındaki değişiklikleri sınırlı miktardaki genetik bilgi yoluyla idare edebilir. Bu olayda iki genel yol vardır ve her iki durumda da konak hücre büyüme işleminin normal düzenlenme kontrolünü kaybeder. DNA tamir yolları sıklıkla etkilenir, genetik değişkenliğe ve mutajenik fenotipe yol açar (7, 65, 66):

1-Tümör virüsleri yeni bir transforme edici geni hücre içine sokar ve doğrudan etkiler.

2-Virüs önceden var olan gen veya genlerin sunumunu değiştirerek dolaylı etki yapar.

Virüsler genellikle tam karsinojen gibi davranmaz. Virüsün işlevleriyle idare edilen değişikliklere ek olarak, hücrenin tamamen transforme olmasının sağlanabilmesi için normal hücrede birden çok düzenleyici yollar ve kontrol noktalarının zayıflatılması için başka mutasyonlar da gereklidir. Viral karsinogenezi sağlayan tek bir transformasyon şekli yoktur. Moleküler düzeyde, insan tümör virüsleri ile olan onkojenik mekanizmalar çok çeşitlidir (73).

Konak hücreleri belirli bir virüs replikasyonu için hücresel düzeyde izin veren veya vermeyen hücrelerdir. İzin veren hücreler virüs büyümesini ve yavru virüslerin üremesini destekler; izin vermeyen hücreler ise desteklemez. Özellikle DNA virüsleri ile normalde konak hücrenin ölümü ile sonlanan virüsün replikasyon döngüsü bir şekilde bloke olmadıkça izin veren hücreler transformasyona uğramaz. Bunun tersine, RNA tümör virüslerinin karakteristik özelliği, çoğaldıkları hücreyi öldürmemeleridir. Bir hücre için izin veren hücreler başka bir virüs için izin verici olmayabilir. Tümör virüslerinin çoğunluğu belirgin bir doku özgüllüğü gösterirler, bu özellik hücre yüzeyindeki virüs reseptörlerinin farklı dağılımına, virüsün yaygın veya lokal infeksiyon oluşturma yeteneğine veya virüs gen ekspresyonu için gerekli hücre içi faktörlere bağlı olabilir. Bazı virüsler tek tümör tipi ile ilişkilidir, diğerleri ise çok sayıda tümör tipi ile ilişkili olabilir. Bu farklılıklar virüslerin doku tropizmlerini yansıtır. Normal bir hücreden neoplastik hücreye stabil bir genetik değişiklik, hücre içinde viral genlerin kalmasını gerektirir. DNA tümör virüslerinde viral genomunun bir bölümü konak hücre kromozomuna entegre olur. Bazen virüs genomunun epizomal kopyaları tümör hücrelerinde saptanır. Bazı virüs sistemlerinde, virüsün

transformasyona uğrattığı hücreler, enfekte olmayan komşu hücrelerin fenotipini etkileyen büyüme faktörleri salgılar, böylece tümör oluşumuna katkıda bulunur (7, 71, 73).

2.2.1. Viral Karsinogenezin Genel Özellikleri

Virüsler insanlarda ve hayvanlarda kansere neden olabilmekle birlikte ender olarak tam kanserojendirler. Fakat doğrudan veya dolaylı yoldan etki gösteren karsinojenik ajanlar olabilir. Virüslerin indüklediği tümör genezde konak faktörleri önemli belirleyicilerdir ve tümör virüsleri doğal konaklarında sıklıkla kalıcı infeksiyonlara sebep olurlar. Virüs birden fazla tümör tipi ile ilişkili olabilir. Virüsün oluşturduğu infeksiyon tümör ile ilişkili tümör oluşumundan daha siktir. Oluşan infeksiyonun başlangıcı ile tümörün ortaya çıkması arasında genellikle uzun süreli latent dönemler olur. Tümör hücrelerinde viral göstergeler genellikle bulunur. Onkojenik bir virüs hücrelerde büyüme kontrol yollarını değiştirir. Viral suşlar onkojenik potansiyel olarak genellikle farklılık gösterir. Viral onkogenез mekanizmaları hayvan modellerinde yapılan çalışmalarla gösterilebilir (74).

2.2.2. Onkogenlerin Mekanizması

2.2.2.1. Hücresel Onkogenler

Onkogen kanserin ortaya çıkmasında etkisi olan genlere verilen genel bir tanımdır. Bu transforme edici genlerin normal versiyonları normal hücrelerde bulunur ve proto-onkogenler olarak isimlendirilir. Hücresel onkogenler akut transforme eden retrovirüslerle yapılan çalışmalarda bulunmuştur. Normal hücrelerin çeşitli retrovirüs transforme edici genleri ile yüksek düzeyde ilişkili fakat aynısı olmayan kopyalarını bulundurduğu; hücresel dizilerin yakalanıp retrovirüs genomlarına girdiği bulunmuştur. Hücresel onkogenler insan kanserinin moleküler temelinde kısmen sorumludur. Hücre çoğalması, bölünmesi ve

farklılaşmasının düzenlenmesinde ve genomunun bütünlüğünün sağlanmasından sorumlu karmaşık yolların bileşenlerini temsil ederler. Bu bileşenlerden birinin yanlış sunumu bu düzeni bozabilir, hücrelerin kontrolsüz büyümesi yani kanser ile sonuçlanır. İyi huylu bir proto-onkogeni active eden ve onu kanser genine çevirmede sorumlu moleküler mekanizmalar değişiktir, fakat hepsinde genetik hasar vardır. Gen yüksek düzeyde sergilenebilir ve bu yüksek düzeyde sergilenmiş onkogen ürününün dozu hücresel büyüme değişikliklerinde önemli olabilir. Bu mekanizmalar normal düzenin bozulması gibi temel kalıcı bir etkinlikle sonuçlanabilir, böylece gen hücre döngüsünde yanlış zamanda veya uygun olmayan doku tiplerinde sergilenir. Mutasyonlar, proto-onkogen ile diğer proteinler veya nükleik asitler arasında dikkatle düzenlenmiş etkileşimleri değiştirebilir. Retroviral destekleyicinin (promoter) hücresel onkojenin yanına girmesi o genin artan sunumu ile sonuçlanabilir. Hücresel genin sergilenmesi, yanındaki viral arttırıcı (enhancer) dizilerin etkisi ile de artabilir (71-74).

2.2.2.2. Tümör Süpresör Genler

Hücreler büyüme esnasında, ürünleri negatif regülatör olarak görev yapan bazı genler kodlarlar. Bu genler çoğunlukla bazı kanserlerde mutasyona uğramış veya silinmiş olduklarından dolayı tümör supresör gen olarak adlandırılır. Bunlar belirli DNA tümör virüsleriyle kompleksler oluşturdukları için tanımlanmışlardır. Hücre büyümesi esnasında negatif ve pozitif regülatörler birlikte kontrollü ve dengeli bir sistem oluştururlar. Küçük DNA virüsleri tümör süpresör proteinleri bağlayıcı ve inaktive edici proteinler üretebilirler ve böylece G1 fazında olan hücreyi S fazına geçirerek hücre döngüsünü harekete geçirebilirler (67).

Tümör oluşması için bir genin her iki allelinin, aktivasyon gereken hücresel onkogenin tersine inaktivasyonu veya kaybı gerekir. Bu inhibitör gen sınıfının prototipi retinoblastoma (Rb) genidir. Rb protein, S evresi genlerin sergilenmesini idare eden anahtar transkripsiyon faktörlerine bağlanarak hücrelerin S evresine girmesini engeller. Normal Rb

proteinin işlevi fosforilasyon ile düzenlenir. Rb geninin fonksiyonunun kaybı genellikle retinoblastoma ve diğer tümörlerin gelişimi ile ilişkilidir. Başka bir kritik tümör baskılayıcı gen P53 genidir. Bu da hücre döngüsünün ilerlemesini bloke eder; P53 transkripsiyon faktörü olarak etki gösterir ve belirli hücre döngü kinazlarının işlevlerini inhibe eden bir proteinin sentezini düzenler. Ayrıca DNA hasarı olan hücrelerin apoptoza girmesine neden olur. P53 işlevinin kaybı DNA hasarı olan hücrelerin döngüye devam etmelerine izin verir, sonuçta genetik mutasyonlar birikir. Bütün insan kanserlerinin yarısından fazlasında P53 geni mutasyona uğramıştır (74).

2.2.3. DNA Tümör Virüsleri

DNA ve RNA tümör virüsleri onkogenleri arasında temel farklılıklar vardır. DNA tümör virüslerinin transforme edici genleri viral replikasyon için gerekli işlevleri kodlarlar ve hücrelerde normal homologları yoktur. DNA virüslerinin transforme edici proteinleri normal hücre proteinleri ile kompleks oluştururlar ve işlevlerini değiştirirler (7).

2.2.3.1. HBV Onkogenezi

HBV, akut ve kronik karaciğer hastalıklarına sebep olan bir insan patojenidir. Siroz ve karaciğer kanserlerinden dolayı ölümün ağırlık gösterdiği ülkelerde bu ölümlerde hepatit B virüsünün payı büyüktür. Virüsün sitopatik bir etkisi yoktur. Fakat karaciğer hasarlarına inflamasyon, apoptozis ve rejenerasyona teşvik eder (76).

Hepatit B virüsünün onkogenezi mekanizması açık değildir. Sürekli viral infeksiyon, zamanla sirozla sonuçlanan nekroz inflamasyon ve karaciğer rejenerasyonuna yol açar. HBV transaktivatör proteini olan X proteini, viral onkogenezin bir potansiyeldir (8).

2.3. Hepatit B Virüsü

HBV; viral hepatit B, serum hepatiti, uzun kuluçka süreli hepatit olarak isimlendirilen infeksiyon hastalığının etkenidir (75).

Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirüs genusunda yer alan HBV özellikle karaciğer hücrelerine tropizm gösterir. HBV, Hepadnaviridae ailesinin üyeleri içinde insanlarda infeksiyon oluşturan tek türdür (76).

2.3.1.Tarihçe ve Sınıflandırma

İlk kez hipokrat tarafından sözü edilen hepatitlerin, insanlığın var oluşuyla ortaya çıktığı düşünülmektedir (77). Varlığı antik çağlardan beri bilinen sarılıkta, ilk kez 1883 yılında direkt kan ve kan ürünleri ile bulaşan hepatit formu, Lurman tarafından tanımlanmıştır. Bremen'de yaşayan 1.289 tersane işçisine çiçek aşısı yapılmış ve uygulamanın ardından 191 işçide bir kaç hafta ile 8 ay arasındaki süre içinde sarılık ortaya çıktığı, aşılınmamış kişilerin ise sağlıklı kaldığı saptanmıştır. Yirminci yüzyılın başlarında kabakulak ve kızamık immün profleksisi amacıyla plazma alan kişiler ile insan serumu içerikli sarı humma aşısı yapılan askerlerde sarılık salgınları görülmeye başlamış; II. Dünya Savaşı esnasında kan transfüzyonu yapılan askerlerde sorunlara neden olmuştur (75, 76, 78). 1908'de Mc Donald salgın hastalığa, bir virüsün neden olabileceğinden bahsetmiş, 1912'de Cockayne epidemik formu tanımlamış ve 'infeksiyöz hepatit' olarak isimlendirmiştir (79). 1930'lu yıllarda gönüllü mahkumlar üzerinde yapılan çalışmalar; serum hepatiti ve infeksiyöz hepatit hakkında önemli bilgiler kazandırmıştır (80). 1943 yılında A.B.D.'nde bulaşıcı hepatite infeksiyöz hepatit adı verilmiş ve yine aynı yıl İngiltere Sağlık Bakanlığı, plazma, serum naklinden sonra gelişen sarılıkları 'homolog serum sarılığı' adı altında toplamıştır (76). 1950'li yılların sonu ile 1960'lı yılların ilk yarısında Krugman ve ark. New York'daki Willowbroke State School'da özürü çocuklar üzerinde yaptığı çalışmalar sonucunda; klinik, epidemiyolojik ve immünolojik olarak birbirinden ayrı iki hepatit virüsünün varlığını saptamışlardır (81). 1963 yılında Avusturalyalı bir yerlinin

serumunda, çok sayıda kan transfüzyonu yapılmış bir hastanın serumu ile agar jelde presipitasyon veren bir antijen, günümüzde HBsAg olarak bilinen Avustralya antijeni-Au antijenininin, National Institutes of Health (NIH) de Blumberg ve ark. tarafından tespit edilmesiyle virüs hepatitleri ve hepatit serolojisinde tarihinde yeni bir çağ başlamıştır. 1965'teki bu buluşlarıyla araştırmacılar Nobel ödülü kazanmışlardır (76, 79, 80). HBV tarihçesinde 1965 yılı dönüm noktasıdır. Hepatit araştırmalarında bu tarihe kadar olan süre gümüş çağ, bundan sonraki dönem ise altın çağ olarak nitelendirilir (80).

1970'de Dane ve ark., elektron mikroskopuyla HBV'nün kısmen saflaştırılmış preparatlarını incelediklerinde üç farklı partiküle rastlamışlardır. Bunlardan 42 nm çapındaki infeksiyöz özelliğe sahip olanlara Dane partikülü adı verilmiş ve sonraki yıllarda, kor antijeni, DNA polimeraz ile viral DNA tanımlanarak, 1974'te virüsün özgül DNA'sı tanımlanmıştır (76, 79, 80).

HBV'nin Hepadnaviridae ailesinin prototipi olarak belirlenmesi önemli bir gelişmedir. HBV'nin keşfinden sonra bazı memeli hayvanlarda ve kuşlarda hepatite neden olan değişik yeni virüsler bulunmuştur. 1978 yılında kronik aktif ve hepatomalı *Marmota monax* (bir dağ sıçanı) otopsislerinde sık bulunan ve Woodchuck Hepatit Virüsü (WHV) adı verilen yeni bir virüs keşfedilmiştir. 1980 yılında Kuzey California'da yaşayan ve *Spermophilus beecheyi* denilen vahşi yer sincaplarından Ground Squirrel Hepatit Virüs (GSHV) izole edilmiştir. Deneysel olarak küçük Amerikan sincapları (chipmunk) ve dağ sıçanlarını da infekte edebilen GSHV'ye doğada sadece Amerika kıtası üzerindeki San Francisco yarımadasının belli bir bölgesinde rastlanmaktadır (82).

Nükleotid sekans analiz çalışmaları sonucunda HBV ile GSHV ve morfolojik olarak insan HBV'ünden ayrılması oldukça zor olan WHV arasında yaklaşık %70 homoloji bulunduğu ortaya konulmuştur. Fakat WHV ve GSHV kendilerine özgü türler dışındaki diğer türlerde infeksiyona sebep olmazken HBV büyük maymunlarda infeksiyözdür (83, 84).

WHV infeksiyonları kronik karaciğer hastalıkları ve sonuçlarında ortaya çıkan karaciğer kanserine model olarak kullanılmaktadır (85). Hepadnavirüs infeksiyonlarının daha iyi anlaşılabilmesi için karaciğerin yapısı, fonksiyonları, akut ve kronik hasar

durumlarında gelişen mekanizmaların iyi bilinmesi gerekir. Karaciğer, kan hemostazı, enerji depolanması mikrobiyal infeksiyonlara karşı bağışıklıkta önemli rol oynayan bir organdır. Çok çeşitli hücre yapısına sahip olmakla birlikte fonksiyonel aktivite esas olarak Kupffer hücreleri, safra kanal epiteli ve hepatositler tarafından yürütülür. Hepatosit ve safra kanalı epitel hücreleri sadece karaciğere özgü, birbirleri ile yakından ilişkili hücrelerdir (76, 86). Karaciğerin %70 ini oluşturan hepatositler majör hücrelerdir ve HBV gibi karaciğere tropizmi olan bir virüsün esas hedefinin bu hücreler olması beklenir. Hepadnavirüs ailesinde yer alan üyelerin tümü için doğrulanmış yegane replikasyon yeri hepatositlerdir. HBV infeksiyonunda karaciğer hasarının en önemli nedeni konağın immün yanıtıdır. Konağın infeksiyona karşı verdiği bağışık cevap çok sayıda hepatositi yıkarak skarlaşma, kan akımında azalma ve safra akımında obstrüksiyona sebep olur ama infeksiyonu elimine edemez. Hepatositler sonuna kadar diferensiye olsalar bile karaciğer hasarına cevap olarak daha fazla proliferere olabilecek kapasiteye sahip hücrelerdir (85, 87).

Hepadnaviridae ailesi DNA polimerazı bulunan, ters transkriptaz aktivitesi sonucu meydana getirilen genomik RNA'nın transkripsiyonu yoluyla replike olabilen, memeli ve kuşlara tropizm gösteren bir gruptur. Bu ailede bulunan virüslerin, virion yapısı, gen sayısı, genom nükleotid dizi homolojisi, konak farklılığı, polipeptit büyüklüğü ve antijenik çapraz reaksiyonları dikkate alındığında, memeli hayvan virüslerinin bulunduğu Orthohepadnavirüs (HBV, WHV, GSHV) ve kanatlı hayvan virüslerinin bulunduğu Avihepadnavirüs (DHBV) olmak üzere iki cins altında sınıflandırılması önerilmektedir (76, 88, 89, 90).

2.3.2. HBV Virüsü ve Genomik Yapısı

2.3.2.1. Virüsün Yapısı

HBV'ü, Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirüs cinsinde yer alan, zarflı, kısmen çift sarmallı ve hepatotropik bir DNA virüsüdür. Hepadnaviridae ailesinin prototip

üyesi olan HBV'ü, ailede insanlarda infeksiyon oluşturan tek türdür (91). İnfekte hücrelerde birden fazla sayıda partikül tipi oluşumuna yol açması nedeniyle diğer hayvan virüslerinden farklı bir yere sahiptir. Kısmen saflaştırılmış HBV preparasyonları elektron mikroskopunda incelenecek olur ise yapı, büyüklük ve miktar gibi farklılık gösteren özellikleri bakımından birbirine benzemeyen üç tip partiküle rastlanır:

- a) Yaklaşık 42 nm. (42-47 nm.) çapında, infeksiöz özellikte, tam bir viryon yapısında, küresel şekilli, Dane partikülleri,
- b) Yaklaşık 22 nm. (16-25 nm.) çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, non-infektif, küresel partiküller,
- c) Özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan 22 nm. çapında, 50-500 nm uzunluğunda nükleik asit ihtiva etmeyen, non-infektif: tübüler partiküller.

Her üç formda, HBsAg adı verilen ortak yüzey antijenine sahip olup, infekte konak serumunda yüksek miktarda (200-500 mg/ml) saptanabilmektedir ve immünojenik özellik göstermektedir. HBs antikoru ile reaksiyon verirler (76, 82, 88, 92). Dane partikülü olarak isimlendirilen virionların yapısı komplekstir; yaklaşık 7 nm kalınlıkta, lipid içerikli, 27 nm çapındaki iç çekirdeği çevreleyen zarfı vardır (93).

Endoplazmik retikulum ve golgi gibi hücre organel temelli salgısal yollarla transferinin sağlanmasını veya virüsün gelişimini sağlayan viral membran, üç viral protein içeren yüzeysel yapıyı oluşturur. Bu proteinler, virüsün endoplazmik retikulum içindeki gelişimi sırasında gerekli olup büyüklüklerine göre, küçük (SHBs/S-HBsAg), orta (MHBs/M-HBsAg) ve büyük (LHBs/L-HBsAg) yüzey antijenleri olarak isimlendirilmektedir (94, 95).

2.3.2.2. Virüsün Genomik Yapısı

Genomik yapısı, 3200 nükleotidden ibaret olması sebebiyle bilinen tüm hayvan DNA virüsleri içerisinde en küçük olanıdır. DNA'nın moleküler ağırlığı 2.3×10^6 dalton, G+C oranı ise yaklaşık %49'dur. Genomu kısmen çift zincirli sirküler bir DNA molekülü olan HBV'nün proteinlerini kodlayan uzun zincir (L veya negatif polariteli zincir) 3200 nükleotid taşır, negatif (-) zincir özelliğindedir ve tam uzunluktadır. 5' ucuna kovalent olarak tutunmuş bir proteine sahiptir. Kısa olan zincir (S veya pozitif polariteli zincir) 1800-2700 arası nükleotid içermesi temelinde pozitif (+) özelliktedir ve değişken uzunluktadır. Bu zincirler ortak baz çiftlerine sahip olup, sirküler bir yapı halinde bulunmakla beraber herbirinin 3' ve 5' uçları birleşik olmadığından aslında lineer molekülüdür. İki sarmal arasında değişik uzunlukta tek sarmallı bir bölge vardır. Negatif zincirin 5' ucunda, sentez sırasında primer olarak görev yapan terminal bir protein bulunurken; pozitif olan zincir tam uzunluktaki zincirden daha kısadır ve pozitif 5' ucunda aynı işlevi yerine getiren bir RNA oligomeri yer alır. Negatif sarmalın 3' ucu ise 9-10 nükleotidlik artık uç (terminal redundancy) ile sonlanır. Bu alan viral replikasyon sırasında pozitif DNA sarmalının sentezindeki kısa zincirin tamamlanmasında ve sonuçta süper kıvrımlı, tamamen çift sarmallı, çember şeklindeki DNA molekülünün oluşumunda rol oynar. HBV DNA'nın çember şeklindeki yapısal bütünlüğü, her iki zincirin 5' uçlarından birbirine tutunması ile gerçekleşir ve bu nedenle hiçbir DNA zinciri kapanmamakta ve sirküler yapı yapışkan (kohezif) uçlarla sürdürülmektedir (75, 96, 97, 98, 99).

Bu bölgeler 10-12 nükleotidlik yinelenen dizinlerden meydana gelmiş sabit bölgeler olup, DR (direct repeats) olarak adlandırılırlar. HBV'nde iki adet DR vardır. Uzun zincirin 5' ucu 1826'nci nükleotidde DR1 içinde, kısa olanın 5' ucu ise 1592'nci nükleotid de DR2 içinde yer alır. DR2 uzun zincirin 3' ucuna yakın bir yerde bulunur (76, 88).

HBV DNA'sı birbirleri ile içe içe olan S (3 zarf proteini; HBsAg, gp36 [Pre-S1] ve gp42 [Pre-S2]), C, X ve P kısaltmaları ile gösterilen 7 viral protein kodlayan, 4 ORF bölgesi içerir (103). Genomdaki nükleotid dizilerinin yarısı, birden fazla mRNA sentezi için kullanılır. Ayrıca aynı ORF'lerde birden fazla başlangıç kodonu bulunur. Bu şekilde birbiri ile ilişkili, birden fazla proteinin sentezi sağlanır. Promotörler, replikasyon sinyalleri

gibi bütün regülatör elementler ORF'ler tarafından kodlanır. HBV genomu bazı bölgelerinde kısmen üst üste çakışan bir kodlama organizasyonuna sahiptir (94, 95, 97, 100, 101).

Örneğin genomun en uzun geni olan P geni; C ve X genleri ile kısmen, S geni ile ise tamamen çakışmış halde bulunmaktadır. Sonuç olarak uzun sarmal 1.5 defa okunmaktadır. Bu sebeple HBV, bilinen hayvan virüsleri içinde en küçük genomik yapıya sahip olmakla birlikte, kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virüstür (101).

2.3.2.3. Virüs Proteinleri

2.3.2.3.1. Yüzey Proteinleri

Gen organizasyonundan uzun sarmaldaki S (surface-yüzey) geni, majör antijen olarak adlandırılan 226 aminoasitten oluşan S proteinini yani yüzey proteinlerini kodlar. Ayrıca başlangıç kodonları farklı olduğu için S geni PreS1, PreS2 ve S bölgelerini içerir ve viriondaki zarf proteinlerini (HBsAg) ve diğer partiküllerdeki tamamlanmamış HBsAg'yi kodlar. HBsAg, önemli bir zarf proteindir ve nötralizan antikorlar tarafından tanınan başlıca epitoplar, hücre membranına enfeksiyöz partiküllerin tutunmasında rol oynayan bölgeleri içermektedir. Pre-S1 geni; bir önceki medium antijen ile birlikte large antijeni (L) oluşturan 108 aa' ten oluşan bir proteini kodlamaktadır. Pre-S2 geni; önceki major antijen ile birlikte medium (M) antijeni oluşturan 55 aa' ten oluşan bir protein kodlamaktadır (91, 93, 102, 103).

2.3.2.3.2. Kor Proteini

C geni üzerinde pre-C ve C olmak üzere iki bölge bulunmakta ve sırayla viral nükleokapsidin bir parçası olan ve C geninin esas ürünü olan kor proteinini (HBcAg) veya

kanda sekrete edilen HBe antijenini (HBeAg) kodlamaktadır. Post-translasyonel süreçte, endoplazmik retikulumda konak proteazları, proteinin karboksi terminalini ayırır ve HBeAg oluşur. HBcAg'nin sentezinin post-translasyonel süreci sonrasında son halini alan ikincil ürün olarak düşünülebilir (93, 104).

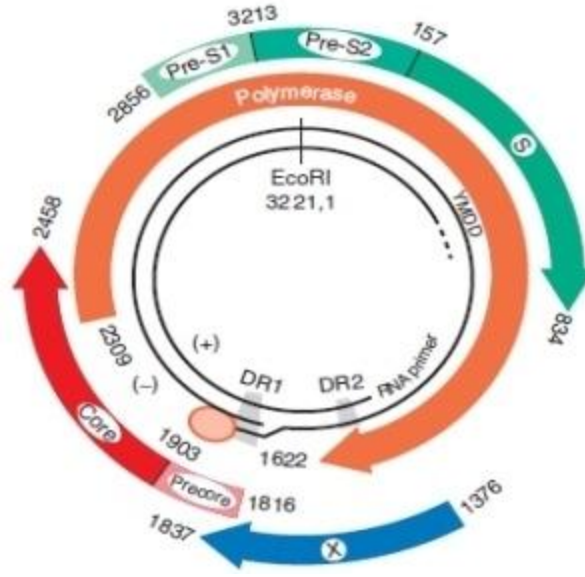
Kor RNA'sı, viral kora paketlenmekte ve major kapsid proteini olan kor proteinini kodlamaktadır. Pregenomik RNA olarak görev yapan kor RNA'sı kendisini kısmen çift zincirli genomik DNA'ya çeviren reverse transkriptaz enzimini yani DNA polimerazı kodlamaktadır (105).

2.3.2.3.3. X Proteini

X geni tarafından kodlanır. HBV X proteini (HBxAg) çeşitli gen düzenleyici fonksiyonlara sahip transkripsiyonel trans-aktivatör bir proteindir (90).

2.3.2.3.4. P Proteini

P geni ise DNA polimerazı kodlamaktadır. Bu sebeple farklı başlangıç kodonlarından sentezlenen proteinler de farklı olmaktadır (91, 100, 102, 103).



Şekil 2.5. HBV'nin genom organizasyonu (106)

2.3.3. HBV Antijen ve Antikorları

2.3.3.1. HBsAg

HBsAg antijeni HBV'nin yüzeyinde kompleks yapıda bulunur ve antijenik determinantlara (a, d/y, w/r) göre başlıca 4 alt tipe (adw, ayw, adr, ayr) ayrılır. W determinantındaki antijenik değişikliklerle (w1,w2,w3,w4 alt tipleri) birlikte 10 majör serotip tespit edilmiştir (79, 107).

HBsAg antijeninin kanda saptanması ilk viral göstergedir ve varlığı aktif infeksiyonun kanıtı olarak kabul edilir. En erken HBV ile temastan 1-2 hafta sonra duyarlı yöntemlerle kanda saptanabilirler. HBsAg saptanmasından ortalama 4 hafta (1-7 hafta) sonra ise hepatitin klinik belirtileri ortaya çıkar. Kendini sınırlayan infeksiyonlarda HBsAg pozitifliği ortalama 1-6 hafta en geç 20 hafta devam eder (108).

2.3.3.2. Anti-HBs

Koruyucu nötralizan özellik gösteren, HBsAg'ye karşı oluşan antikordur. Genellikle HBsAg varlığının serumda kaybolmasından bir süre sonra Anti-HBs saptanır. Bu ara süreye pencere dönemi denir. Bu devre dikkate alınarak anti HBc IgM araştırılmazsa tanı atlanmış olur. B tipi akut viral hepatit geçirenlerin %5-15'inde anti-HBs oluşmamaktadır. İnfeksiyondan sonraki 6-12 ay boyunca kandaki anti-HBs titresi yükselişini sürdürür ve daha sonra pozitiflik yıllarca devam eder (108). Aşılama ve Ig transfüzyonu sonrasında serumda tek başına anti HBs pozitifliği saptanır (79).

2.3.3.3. HBcAg

42nm çapında olan virionun kimyasal maddeyle parçalanması sonucunda izole edilebilen 27 nm çapındaki nükleokapsid kor partikülü, dışarıdan HBsAg ve lipid içeren bir zarf ile örtülmüştür (109). İnfekte karaciğer dokusunda saptanabilir ancak dolaşımda saptanamaz (79).

2.3.3.4. Anti-HBc

HBcAg'ye karşı oluşan antikordur. Anti-HBc IgM, HBsAg'nin saptanmasından 1-2 hafta sonra serumda pozitifleşir ve hastalığın akut devresinde bütün hastalarda saptanmaktadır. Pozitifliği 6-24 ay devam edebilir. HBsAg'nin saptanamadığı %5 kadar hastada serumda yüksek titrede anti-HBc IgM antikordur tanıya yardımcı olur (110).

HBV enfeksiyonu geçiren kişilerde, anti-HBc IgG çok uzun süre hatta ömür boyu pozitif kalabilir. Ayrıca kronik enfeksiyon sırasında reinfeksiyon gelişirse tekrar saptanabilir düzeylere çıkabilir (109).

2.3.3.5. HBeAg

HBsAg ile birlikte ya da çok kısa bir süre sonra serumda belirir ve iyileşen olgularda ortalama 10 hafta sonra yani HBsAg'nin kaybolmasından birkaç gün önce negatifleşir. Hem akut hemde kronik hepatitlerde infektivite işareti olarak kabul edilir (108).

HBeAg, viral DNA sentezi için kalıp olarak kullanılan pregenomik RNA (pgRNA)'dan sentezlendiği için HBeAg'nin yüksek miktarda olması fazla miktarda pgRNA sentezlendiğini, yani aktif viral serumda 10 haftadan daha uzun süren pozitifliği kronikleşme eğilimini yansıtabilir (109).

2.3.3.6. Anti-HBe

HBeAg'ye karşı oluşmuş antikordur. Anti-HBe saptanan taşıyıcıların infektiviteleri düşüktür. Pozitifliği birkaç ay-yıl devam edebilir (79).

HBV infeksiyonlarında saptanan bir başka viral gösterge DNA ve DNA polimeraz içeren virionlardır. Bu partiküller HBsAg'den sonra ortaya çıkar ve varlıkları DNA polimeraz aktivitesi veya viral DNA ile hibridizasyon yapılarak araştırılır. İnkübasyon döneminin son günlerinde yüksek konsantrasyonlara ulaştıktan sonra, hepatit tablosunun gelişmesi ile düşmeye başlarlar ve genellikle hastanın iyileşmesine yakın günlerde serumda saptanamazlar (108).

2.3.4. Replikasyon Stratejisi

HBV'nin yaşam döngüsü birkaç aşama şeklinde değerlendirilebilir (111):

- 1-Virüsün spesifik konak hücrelerine bağlanması
- 2-Virüsün konak hücrelerine girmesi (penetrasyonu)

- 3-Replikasyonun gerçekleşeceği bölgeye taşınım
- 4-Viral genomun salınması
- 5-Viral gen ürünlerinin transkripsiyonu ve translasyonu
- 6-Oluşan ürünler ile viral replikasyonunun başlaması
- 7-Virionların oluşması
- 8-Oluşan virüslerin hücreden ayrılması

Birçok virüsten farklı olarak HBV, yeni sentezlenen viral DNA'nın sitozolden çekirdeğe girmesine izin veren daha ileri bir arayol içermektedir (111).

HBV'nin hücreye bağlanması kritik bir aşamadır ve birçok virüs ve konak hücre reseptörleri arasında etkileşim olmaktadır. Fakat etkileşime giren reseptörler ve etkileşimleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (112, 113).

Temel olarak HBV'nün yaşam döngüsü, virüsün hepatosite tutunması ve reseptöre bağlı endositoz temelli hücreye girmesi ile başlar. HBV'nün tutunduğu hepatosit reseptör veya reseptörler fibronektin, apolipoprotein, poli-insan serum albumini, interlökin-6 olabileceği düşünülmektedir. HBV'nün konak hücreye bağlanmasında rol oynadığı düşünülen fibronektin, transferrin reseptörü, apolipoprotein H, polimerize insan serum albumini, pre-S2 glikan, HBV bağlayan faktör gibi birçok reseptör adayı tanımlanmıştır (97, 114, 115).

Son yıllarda, her ne kadar, S proteinine özgü bazı reseptörlerin (endonexin II, siyaloglikoprotein vb.) varlığı gösterilmiş olsa da, HBV'nün hepatositlere tutunmasında L ve M proteinlerinin de önemli olduğu saptanmıştır. In vitro olarak pre-S1 ve pre-S2'de karaciğere spesifik tutunma bölgeleri tanımlanmıştır (76, 88).

Hepadnavirüslerin viral replikasyonunda üç önemli özellik vardır (116):

1- DNA sarmallarının sentezi sırasında negatif iplikçiğin sentezi pozitif iplikçiğin sentezinden önce tamamlanmalıdır.

2- Viral polimeraz aynı zamanda, reverstranskriptaz olarak fonksiyon görür.

3- Negatif iplikçiğin sentezinde 5' ucuna kovalent olarak bağı terminal protein prime edilirken, pozitif iplikçiğin priming'i viral genomik RNA'dan derive olan bir oligoribonükleotiddir.

Virüs, hepatositlere bağlanma sonrasında membran füzyonu yoluyla ve nükleokapsid hücre membranında kazandığı endozom ile viral nükleokapsid sitoplazmaya girerek pasif difüzyon ve tübüler taşınım şeklinde nükleusa taşınır (117). Taşınma alfa ve beta hücresel transport reseptörleri aracılığıyla gerçekleşmektedir ve işlem kapsid proteinin fosforilasyonuna bağlıdır (118).

Virial replikasyonun başında polimeraz enzimi, kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA relaxed circular DNA (rcDNA)'nın tamamlanmasında rol oynar (93, 119).

Virial genom nükleusta kapsitinden ayrılır. Her iki ucu serbest halde bulunan ve eksik olan bölümü, kısmen çift sarmallı DNA'nın kısa sarmaldaki pozitif zincirin 5' ucundaki boşluk RNA oligonükleotid tarafından tamamlanır. Bu esnada uzun sarmalın 5' ve 3' uçları arasındaki açıklık da onarılmış olur. Konak tamir enzimlerinin bu süreci gerçekleştirdiği sanılmaktadır. Sonuç olarak tamamen süper kıvrımlı, çift sarmallı, uçları kapalı sirküler yapıda olan bir covalently closed circular HBV-DNA (cccDNA)'sı meydana gelir. Virüs enfeksiyonundan yaklaşık 24 saat sonra cccDNA oluşumu görülmektedir (93, 119).

Replikasyon normal seyrindeyken HBV-DNA'nın konak genomuna integrasyonuna rastlanmaz. Ayrıca epizom olarak replike de olmaz, daha ziyade sirküler tek bir DNA kopyası olarak bulunmaktadır. HBV ile infekte olmuş kişilerin serumlarında nadir de olsa HBcAg' nin varlığı gösterilmiş olsa da, bu antijen viral replikasyon sırasında konak hücre çekirdeğinde sıklıkla tespit edilebilmektedir. Bu sebeple HBcAg' nin nükleusa girmesinin cccDNA'nın ortaya çıkmasından önce olduğu tahmin edilmektedir (88, 97, 116, 118).

Nükleusta, kalıp olarak cccDNA'dan, konak hücre RNA polimerazının (RNA polymerase II) yardımı ve viral düzenleyicilerin (4 adet promoter; 2 adet enhancer) etkisiyle viral RNA'lar sentezlenir. HBV-RNA'ların hepsinin 3' uçları aynı nükleotidde

(1934'üncü nükleotid) olup, C genine ait ORF'den gelen sinyalin özelliğine göre ya mRNA, ya da pregenom şeklinde rol oynarlar. Kor promotör bölgesi viral replikasyonun merkezidir ve negatif zincirli viral genomundan daha uzun olan 3,5 kb'lık pgRNA sentezlenir ve pgRNA'dan da 4 tip mRNA sentezlenir (97, 112):

-Uzunluğu genomdan fazla olan 3.5 kb'lık kalıp, pre-C/C ile polimeraz proteinlerinin ekspresyonundan ve viral replikasyondan sorumludur.

-Uzunluğu 2.4 kb olan transkript Pre-S1, pre-S2 ve S proteinlerinin sentezinde kullanılır.

-2.1 kb'lık olanı ise, HBsAg'ni kodlarken pre-S1 haricindeki yüzey proteinlerini kodlamaktadır.

-0.7 kb uzunluğu ile en küçük olan m RNA ise X proteininin sentezinden sorumludur.

Replikasyon konak hücre sitoplazmasında devam eder ve 3.5 kb lık (+) yüklü RNA'dan (-) DNA sarmalı sentezlenir (116).

pgRNA, öncelikle 200-300 moleküllük çekirdek proteinini sentezletir. Ardından kor bölgesi içinde kalan bir başlangıç kodonundan polimerazın sentezine başlamasına izin verir. Sentezlenen polimeraz kendi mRNA'sının 5' ucuna bağlanarak ters transkripsiyonu başlatır ve aynı anda çekirdek içine yerleşir. Polimerazın sentezlenmesiyle pgRNA sentezi durur. pgRNA'nın 5' ucunda bulunan enkapsidasyon dizisi adı verilen diziler viral polimeraz enzimini bağlar ve viral korun yapımı başlar (120).

Çekirdek proteinleri ikiyeşerli yapılar halinde bir araya gelir ve disülfid bağları ile stabilize olur. Bu birimlerden 120 tanesi bir araya gelerek ikozahedral kapsidi oluşturur. Negatif iplikçiğin sentez aşaması; direkt tekrar (DR)1 bölgesinin 3' ucundaki terminal proteinin bulunduğu yerden başlar. Enkapsidasyon dizisi taşıyan pgRNA'lar kapsid içine yerleşir ve pgDNA'dan ters transkripsiyon ile negatif zincirin sentezi viral çekirdek içinde, sitoplazmada gerçekleşir. Bu olayda enkapsidasyon dizisi çekirdek içine bir kopya nükleik asit yerleşmesini sağlar ve ayrıca viral DNA sentezini başlatmada da rol oynar. Negatif DNA sentezlendikten sonra viral polimerazın RNase H aktivitesi ile pgRNA yıkılır ve DNA polimeraz aktivitesi ile 5' ucundaki RNA primeri kullanılarak pozitif zincir

sentezlenir. Burada uzun sarmal, kısa zincirin sentezinde kalıp olarak kullanılır. Pozitif zincir sentezi için negatif zincirin 5' ucundaki DR 1 bölgesindeki primer, DR 2 bölgesine taşınır. Sentez 3' ucundan başlar ve uzun zincirin 5' ucundaki terminal proteine geçilinceye kadar devam eder. Sentez DR2'nin (-) iplikçiğın 3' ucundaki 9-10 nükleotidlik terminal artık sayesinde, genomun sirkülasyonu gerçekleşir. Her iki zincirin 5' uçları bu nedenle farklıdır. Pozitif zincirin yani kısa zincirin sentezi tamamlanamaz ve eksik kalır. Bunun sebebi kısmen çift sarmallı sirküler yapıdaki kor kısmının kılıf proteinleri tarafından çevrelenmesi ve aynı zamanda polimerazın da tükenmesidir. Her iki zincir 5' uçlarından bağlanmasıyla rcDNA sentezi tamamlanmış olur (76, 88, 93, 97, 99). Viral genomun oluşmasının ardından, endoplazmik retikulum içinde partiküller tomurcuklanarak glikoprotein zarfını kazanır ve veziküler taşınım ile hücre dışına salınır (93).

HBV replikasyonu sırasında sitoplazmada sentezlenen viral DNA'ların bir kısmı çekirdeğe taşınarak orada sürekli cccDNA havuzu oluşturulmasını sağlar. HBsAg cccDNA formasyonunu inhibe ettiğinden bunun HBV replikasyonunda negatif feedback mekanizması olduğu kabul edilir (76, 98).

2.3.5. Duyarlılık-Dirençlilik

HBV, -20°C de ise yıllarca, serum içinde ise 30-32°C' de 6 ay canlılığını korur. Kurutulmuş virüs 25°C' de saklandığında bir hafta süreyle canlılığını devam ettirir. Virüsü inaktive etmek için, kuru sıcak hava ile 180°C'de 1 saat, otoklavda 121°C'de 15 dakikada yeterlidir. Kaynatma ile 10-20 dakikada inaktive olur. Kurutulmuş virüs 25°C'de saklandığında 1 hafta sonunda canlılığını yitirir. HBsAg içeren kan, plazma ve diğer kan ürünlerinin ultraviyole ışınlarına tabii tutulmasının infektivite ve antijenik yapı üzerine etkisi yoktur. Kimyasal ajanlardan; %0.1-%0.2 glüteraldehit, %0.5-%1'lik sodyum hipoklorid (veya 500 ppm serbest klor) izopropil veya etil alkol virüsü inaktive eder (88, 108, 121).

2.3.6. HBV Subtip ve Genotipleri

Filogenetik analizlere göre, HBVnin, %8 i tüm genom dizisinde, %4'ü aşan oranda ise S geninde farklılık taşıyan varyantlar olması sebebiyle, HBV genomunun A, B, C, D, E, F, G ve H olmak üzere 8 farklı genotipinin olduğu belirlenmiştir (122).

İlk kez 1988 yılında Okamoto ve ark., tüm HBV genomu içinde %8 veya daha fazla ayrılık ile A'dan D'ye kadar 4 genotipi tanımlamıştır (123). 1992 yılında Norder ve ark., daha önceden Okamoto ve ark. tarafından sınıflandırılması yapılan HBV genomlarının S gen dizilerini sınıflandırarak, genomlar arasında %4.1 kadar küçük farklılığı göstermişlerdir. Bu nedenle de, E ve F olarak adlandırılan iki yeni genotipi S gen seviyesinde en az %4 oranındaki farklılığı kullanarak tanımlamışlardır (124). Ardından D ve H genotipleri ise Belçika ve Orta Amerika'dan bildirilmiştir (125, 126). Yapılan çalışmalarla birlikte genotiplemenin, HBV genomunun pre-S ve S genlerinin bir kısım dizilerinin ortaya çıkarılmasıyla mümkün olduğu gösterilmiştir (127).

HBV genotip A, B, C, F ve H genom uzunluğu 3215 nükleotid iken delesyon ve insersiyonlardan dolayı, genotip G genomu 3248 nükleotid ve genotip D genomu ise 3182 nükleotid uzunluğundadır (128).

Kapsamlı filogenetik analizler, HBV genotiplerinin kendi içlerinde en az % 4 farklılık gösteren subgenotiplere sahip olduğunu göstermiştir. HBV genotip A, B, C, D ve F subgenotipleri sırasıyla A1/A2, B1/B2/B3/B4, C1/C2/C3, D1/D2/D3/D4 ve FIa/FIb/FII/FIII/FIV şeklindedir. HBV genotip E ve G'nin ise subgenotipleri yoktur (128, 129).

HBsAg alt tiplerine göre HBV izolatlarının gruplandırılması 30 yıl önce gerçekleştirilmiştir. Alt tip spesifiklerinin ekspresyonuna katılan HBsAg epitoplari molekülün 2 eksternal ilmeğini (loop) içeren bir bölgedir ve HBV suşlarını antijenik olarak çeşitli yapmaktadır. Aynı bölge bilinmeyen sayıda epitop içermektedir. Bu epitoplar bütün wild-tip HBV suşlarında ortak olarak bulunan HBsAg'nin "a" determinanti olarak tanımlanmaktadır. Belirli HBsAg alt tipleri tarafından "a" determinantına karşı oluşturulan antikorlar HBV partiküllerinin infektivitesini nötralize edebilmektedir. Bu da bütün alt

tiplere karşı çapraz korumayı ve mevcut HBV aşılıları tarafından indüklenen koruyucu immüniteyi oluşturmaktadır. HBsAg alt tipleri; ortak bir örnek determinantların iki seti ile (d/y ve w/r), 4 farklı alt özellikte w determinanti (w1-w4) ve eksprese edilen üçüncü bir determinant olan q ile tanımlanmaktadır. HBsAg alt tiplerinin gösterilmesi ise; ortak “a” determinanti ile başlamakta, sonrasında da suşta identifiye edilen alttip determinantları ile devam etmektedir (örneğin, “adw2”, “ayr”) (102).

S geninin dizi analizi hem genotipleri hem serotipleri tanımlayabilmesine karşın, genotipler ve serotipler tam olarak birbiri ile örtüşmemekte, serotip benzerlikleri genetik ilişkiyi doğrulamamaktadır. HBsAg alt tipleri ile HBV genotipleri arasında bazı ilişki gözlenmiştir. Fakat birçok genotip iki veya daha fazla alt tip ile ilişki içinde bulunabilmektedir (130).

Virüsün coğrafi dağılımı ile genotiplerin serotipe göre daha uyumlu olduğu ve moleküler epidemiyolojik çalışmalar için genotiplerin kullanımının daha yararlı olduğu belirlenmiştir. Farklı genotiplerle koinfeksiyon ve genotipler arası rekombinasyon olasılığı da çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (131). HBV genotip/alt genotiplerinin biyolojik özelliklerinde farklılık da olabileceği belirtilmektedir. HBV genotip/alt genotiplerinin küresel dağılımındaki heterojenite, sadece farklı popülasyonlarda HBV mutasyonlarının prevalansındaki farklılığa sebep olmayıp, HBV infeksiyonlarının klinik seyri ve antiviral tedaviye yanıtındaki farklılıktan da sorumlu olabileceği giderek anlaşılmaktadır (130).

HBV genotip ve subgenotipleri coğrafya üzerinde özgül bir dağılım gösterir. Genotip A, Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika, Hindistan ve sahra altı Afrika ile birlikte az olmakla birlikte Güney Amerika’da yaygınlık gösterir. Genotip B ve C ise Asya’da endemik iken genotip D daha çok Akdeniz çevrelerinde ve Doğu Avrupa’da yaygınlık göstermekle birlikte tüm dünyada görülebilmektedir. Genotip E, Batı Afrika; genotip F, Güney Amerika ve genotip H ise Orta Amerika’da yaygındır. Son olarak genotip G ise Fransa, Almanya, Orta Amerika, Meksika ve ABD kapsamında yaygındır. Ayrı ülkeler ve bunların yerel bölgelerinde, risk grubuna dahil popülasyon grupları farklı prevalans oranlarına sahip spesifik genotipler barındırabilmektedir (128).

Türkiye’de şimdiye kadar yapılan çalışmalarda HBV genotiplerinin dağılımı incelendiğinde ağırlıklı olarak (%100) D genotipinin bulunduğu gözlenmektedir (132-139).

Belirli genotipler ile şiddetli karaciğer hastalığı arasında bağlantı kurmaya çalışan birçok çalışma yapılmıştır. Fakat tartışmalı sonuçlara ulaşılmıştır. Bunlardan HBV genotip D enfeksiyonunun ciddi karaciğer hastalığı ile ilişkili olduğu ve asemptomatik taşıyıcılar ile karşılaştırıldığında HSK’lı hastalarda genotip D’nin genotip A’dan daha yüksek prevalansa sahip olduğu bildirilmektedir (139, 140).

2.3.7. İmmün Kaçış Mekanizmaları

Konak immün sisteminden kaçabilmek için HBV çok farklı stratejiler geliştirmektedir. HBV'ne ve konağa ait olan bazı özellikler, virüsün immün sistem tarafından tanınmasını engelleyebilmektedir. HBV, reverse transcriptase enzimine sahip olma özelliği ile intrasellüler evrimi esnasında, kendi DNA'sını konak hücrenin genomuna entegre etmekte ve böylece bağışık yanıtın ortaya çıkması ile ilgili süreçte görünmez hale gelmektedir. Prekor/kor geninde mutasyonları oluşturarak immün yanıt için kilit hedeflerden biri olan HBeAg ekspresyonunda kayba yol açarak saklanabilmektedir (141).

HBeAg sentezlenmeyen mutant virüsler ile replikasyon sürmekte ve enfeksiyon devam etmektedir. Akut enfeksiyonda virüsün temizlenmesinde etkin olan antikorlar, yüzey antijenlerindeki a determinant değişikliğine neden olan mutasyonlardan dolayı nötralize etki göstermeyebilmektedir (93, 111).

Başta karaciğer olmak üzere birçok dokuda HBV bulunabilir. Karaciğerden farklı olarak pankreas ve böbreklerde mikrovasküler bariyer sistemi vardır ve bu sebeple virüsün bu organlardaki varlığı immün kaynaklı doku hasarına yol açmaz. Fakat böbrekler ve pankreas potansiyel bir rezervuar haline gelir. HBV ile tekrar tekrar infekte olan karaciğerde, viral temizlenme azalır. Bu durum viral persistansı kolaylaştırır (141).

Beyin, gözün ön kamerası vb. dokularda lenfosit sayısı diğer dokulara oranla az olduğundan dolayı immünolojik olarak imtiyazlı bölgelerdir. Akut HBV enfeksiyonunda;

kılıf proteinlerine karşı oluşan antikorların serbest halde bulunan virüslere bağlanarak bir kompleks oluşturduğuna, virüsün duyarlı hücrelere tutunup girmesinin engellendiğine ve kan dolaşımının virüsten temizlendiğine inanılmaktadır. İşte bu aşamada, farklı sebeplerle HBsAg ekspresyonunda bir azalma olur veya yüzey proteinlerini kodlayan genlerde mutasyon oluşur ise anti-HBs varlığına rağmen infeksiyon devam eder (142, 143).

Birbirinden farklı en az üç mekanizma immün kaçışta rol oynar (144, 145);

1. MHC ile bağlanmayı sağlayan bölgedeki peptid epitoplarını oluşturan aminoasitlerdeki mutasyonel değişiklikler antijen sunumunu etkileyebilir.

2. TCR temas residülerinde veya bu bölgenin konformasyonundaki mutasyonlar sonucu TCR'ün MHC-peptid kompleksine afinitesi kaybolur. T hücreleri kendine sunulan antijenleri tanıyamaz. Bu durumda T hücre aktivasyonu önlenir.

3. Proteinin peptid bağlarında değişiklikler (APL; Altered Peptid Ligands) meydana gelebilir. Bu durumda antijen aynı MHC molekülüne bağlanır ve antijene özgü aynı TCR ile ilişkiye girer. HBV kor proteininin T helper hücre epitoplarında meydana gelen mutasyonların antijen tanınmasında kayba yol açarak konak için daha yararlı olan hafif seyirli bir hepatite neden olduğu bildirilmiştir (146, 147). Dolayısıyla; viral genomun translasyonuna ihtiyaç göstermeyen viral proteinleri sunma yeteneği olmayan HLA molekülünü eksprese eden bir hasta, infeksiyonun ilk dalgasına karşı cevap oluşturamaz. Bu durumda immün kaçış ve infeksiyonun kronikleşmesi kolaylaşır (148, 149).

Konu ile ilgili bir diğer determinant; TCR varlığıdır. T hücrelerinin MHC-peptid kompleksine cevap verme yeteneği TCR özgüllüğü ile belirlenir. TCR varlığının, konağın MHC geçmişi ve self peptidleri ile şekillenir. T hücreleri gelişimleri sırasında kendi MHC'leri tarafından sunulan yabancı proteinleri tanıyacak ama organizmanın kendi peptidlerine veya yabancı MHC'lere kayıtsız kalacak TCR'ler eksprese ederler. T hücrelerinin gelişimi sırasında TCR2'nin seçimi, T hücrelerinin %95'inde delesyona yol açabilir. T hücrelerinin algılarındaki boşluklar nedeni ile bazı kişiler bazı viral proteinleri tanıyamaz (141, 150).

2.3.8. Hepatit B Virüs Mutantları

HBV'nin replikasyon etkinliğine (10^{11} partikül/gün) oldukça yüksek olmasına rağmen 2×10^4 baz değişikliği/yıl oranından daha düşük mutasyon hızı gösterir.

Bu oran polimeraz aracılı geri okuma fonksiyonu olmayan virüslere göre daha düşük bir oranda olmasına rağmen mutasyon oranının birçok DNA virüsünde görülen mutasyon oranından 10 kat daha yüksek olduğu bildirilmektedir (151, 152).

DNA'sı kısmen çift sarmallı olan HBV, yaşam döngüsü sırasında pgRNA'dan revers transkripsiyonla DNA'ya dönüşür. HBV hızlı replikasyon yeteneğine sahip olan bir virüs de olsa; revers transkriptaz enziminin ilk okuma yeteneğindeki zayıflık nedeni ile bu esnada nükleotidlerin yerleşiminde hatalar meydana gelebilmekte, genomda küçük mutasyonel değişimler ortaya çıkmaktadır (115, 153). HBV genomunda yer alan ORF'lerin üst üste binmesinin (overlap) de kaçınılmaz bir mutasyonların gelişmesine yol açtığı bildirilmektedir (90).

Ayrıca bu bölgelerde oluşan mutasyonlar diğer genlerde de değişiklik oluşturabilmektedir (153). Bunun yanı sıra konak-virüs etkileşiminin bir sonucu olarak, enfeksiyonun doğal seyri sırasında antiviraller ile konak immün yanıtının baskısı altına alınması veya spesifik tedavi ile HBV genomunda dereceli olarak oluşan bazı değişikliklerin de mutasyon gelişiminde katkısının önemli olduğu belirtilmektedir (100, 154).

HBV nükleotid sekanslarının özellikle bazı bölgelerinin (hot spot) mutasyonlara duyarlı olduğu belirtilmektedir (100). Mutasyon gelişimi HBV genomunda raslantısal bir şekilde meydana gelmekte ve oluşan mutasyonlar, virüsle oluşturduğu uyum derecesine bağlı olarak replikasyon döngüsü ile sayısını artırmakla birlikte meydana gelen mutant virüsler prevalans kazanmaktadır (151, 155).

Genom üzerindeki herhangi bir yerde (S, pre C/C, X, P, promotor ve enhancer) ortaya çıkabilen bu mutasyonların;

a-Tek bir taban bazının değişimi (nokta mutasyonu),

b-Bir veya daha fazla sayıda nükleotidin silinmesi,

c-Aynı sekansın düz veya ters biçimde tekrar edilmesi,

d-Nükleotid sekanslarının yeniden düzenlenmesi, gibi farklı genetik mekanizmalarla oluşmaktadır.

Bu nedenler ile HBV mutantlarının önemi; mutant süşun hayatiyetini devam ettirmesine imkan sağlamakta, aşu çalışmalarında ise başarısızlıklara yol açmaktadır (115, 153).

Hepatit B hastalığının klinik seyrinde de oluşun mutasyonlar önemli etkilere sahiptir. HBV’de oluşabilecek mutasyonlar (156);

1- Virüsün antijenik yapısının değişmesine immün yanıtta kaçış mekanizmalarının oluşmasına, sebep olabilir.

2-Antiviral ilaçlara karşı direnç gelişimine neden olabilir.

3- Virüsün hücreye girişini ve entegrasyonunu kolaylaştırabilir

4- Virüsün replikasyon sayısının artması ile şiddetli klinik sonuçlara neden olabilir.

2.3.8.1. S (Yüzey) Mutantları

S gen bölgesinde oluşun nokta mutasyonlar, HBsAg’ye karşı immün sistem cevabını etkilemektedir. Çünkü nötralizan antikorların hedefi olan a determinantını (121-149’uncu aminoasitler) etkilemektedir. HBsAg, poliklonal antikor cevabının oluştuğu temel bir hedeftir. Yüzey mutasyonları nedeniyle HBV ile infekte hastalarda, HBsAg saptanamayabilmektedir (10, 156). Daha az karşılaşılmakla birlikte, yüzey geni ile alakalı mutasyonlara preS1 ve preS2 bölgelerinde de bir sekansın yer değiştirmesi, yeniden düzenlenmesi veya silinmesi şeklinde olmakla birlikte rastlanılabilmektedir (10).

PreS gen bölgesinin neredeyse tamamı P gen bölgesindeki virüs için zorunluluk taşımayan spacer bölgesiyle çakıştığından dolayı, burada oluşun birçok mutasyonun virüs için yaşamsal öneme sahip olmadığı düşünölmektedir (157). Fakat bazı mutasyonlar PreS1 proteininin (MHBs) sentezinin durmasına neden olarak virion sekresyonunun inhibisyonuna sebep olmaktadır. Bu durum ise sitotoksititeye sebep olmaktadır (158).

PreS2 delesyon ya da ATG yanlış eşleşme mutasyonları, B ve T hücre epitoplarında değişimlere ayrıca PreS2 proteinin sentezinin durmasına neden olabilmektedir (129).

2.3.8.2. X mutantları

X geninde oluşan mutasyonların fonksiyonel önemi tam olarak aydınlatılmamakla beraber bu tip varyantların replikasyon yetenekleri düşük, infektiviteleri zayıftır (159). X gen bölgesi, kor promotör, enhansır II, DR1 ve DR2 gibi virüs ekspresyon ve replikasyonda önemi olan diziler içermektedir. PreC gen bölgesi ve P geninin RNase H bölgeleriyle ortak diziler içeren X gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlar, virüsün replikasyon ve ekspresyonda sonuç olarak da klinik açıdan değişimler oluşturabilmektedir (160).

HBeAg ve HBsAg'si negatif olan hastalarda, 1752-1772 arasındaki nükleotidlerde (20 nükleotidlik) delesyonun ve genin 3' ucunda kor promotör/enhansır II bölgesinde 1770-1778 nükleotidleri arasındaki delesyonun (8 nükleotidlik) PreC promotör bölgesinin ifade edilmesini azalttığı ve bunun da HBV protein salgısındaki baskılanmanın nedeni olabileceği düşünülmektedir (104). Yapılan çalışmalarda X geninin C terminal ucunda meydana gelen mutasyonlar sonucunda X proteini eksik ifade edilmektedir. Tam ifade edilmemiş X proteinin HSK ile yakından ilişkisinin olduğu bildirilmiştir (161).

2.3.8.3. Kor ve Prekor Mutantları

HBeAg, nükleokapsidin temel proteini olup kor mRNA tarafından ifade edilirken, HBeAg proteini ise prekor mRNA tarafından ifade edilir. Kor mutasyonları konak immun sistemden kaçış mekanizmalarını oluşturan viral stratejiler içinde değerlendirilir. Bunun sebebi ise HBeAg viral polimeraz ile pgRNA'nın kapsid yapısı içine alınması için

gereklidir. Kapsid proteini de T hücre bağımlı veya bağımsız antikor üretimine ve B hücre aktivasyonuna sebep olduğundan dolayı virüsün immün yanıt meydana getirmesinde önemlidir (104).

Prekor bölgesinde görülen en önemli mutasyon, HBeAg üretiminin durmasını veya azalmasını sağlayan bir stop mutasyonu olan 1896 nt (ya da kodon 28) mutasyonudur. HBeAg sentezini engelleyen bir diğer mutasyon ise, iki farklı noktada HBeAg sentezini engelleyen 1862 nt mutasyonudur. Bu mutasyon hem pgRNA'nın ters transkripsiyonun engellenmesiyle hem de sinyal peptid ayrılma bölgesine yakın olduğu için HBeAg sentezinin durması sonucunu doğurur. Prekor mutantları fulminan ve kronik hepatit ile akut-non fulminan hepatitli hastalarda görülebilmektedir (10, 104,162). Bu bölgedeki mutasyonlar ile hepatositlerde, enkapside olmamış replikasyon araçlarının birikmesi ve viral birleşmenin (viral assembly) bloke olması ile viral replikasyonu etkilerler. Bu durum, replikasyon araçlarının kromozomal DNA'ya entegrasyonunu artırarak hepatokarsinogeneze katkıda bulunmaktadır (163). Kor gen mutasyonları epidemiyolojik olarak hastalık aktivitesi ile ilişkili iken prekor stop mutasyonu kliniğe daha az yansiyabilir (104).

2.3.8.4. Bazal Kor Promotör (BCP) Mutantları

Bazal kor promotör gen bölgesi (1744-1804 nt), prekor gen bölgesinin üst kısmındadır (upstream) ve bu bölge viral replikasyonu düzenlemektedir (163).

Ters transkripsiyon için önemli olan DR1 bölgesini içerir ve X gen bölgesinin C terminal ucu ile üst üste gelerek hem kor hem de prekor gen bölgelerinin transkripsiyonunu kontrol ederek ters transkripsiyon için kalıp görevi görerek pgRNA'yı hazır eder (10, 104, 111, 164, 165).

HBeAg üretiminin azalmasını veya durmasını sağlayan bazal kor ve promotör bölgesi mutasyonları, 1762 nt ve 1764 nt mutasyonlarıdır ve HBeAg üretimini % 70 oranında düşürerek viral replikasyonu arttırmaktadır. Bu mutasyonlar promotör gen bölgesi

mutasyonları olduğundan dolayı, kor proteinini veya pgRNA transkripsiyonunu etkiler. Temelde kor RNA başlangıç kodonlarındaki ifadenin azalacağından ötürü, dolaylı olarak gerçekleştirilir. Ayrıca BCP mutasyonları ileri safhalarda transkripsiyon faktörü (hepatosit nükleer faktör 1-HNF bağlanma bölgesini ve X gen mutasyonlarına paralel şekilde etki ederek viral replikasyonu arttırabilmektedir (104).

2.3.8.5. Polimeraz Mutantları

Polimeraz gen ürünleri HBV viral RNA'nın genomik viral DNA'ya dönüştürülmesi ve viral RNA'nın kor partikülü içinde kapsidasyonu için gereklidir. Bazı mutasyonlar HBV ters transkriptaz oldukça korunmuş olmasına rağmen, tanımlanmıştır. Polimeraz geninde HBV RNA'nın kor partikülü içine paketlenmesine engel olduğu gösterilen bazı yanlış eşleşme mutasyonları tanımlanmıştır (10). Polimeraz mutasyonları sebebiyle ortaya çıkan en önemli klinik sonuç ise antiviral direncin oluşmasıdır (93).

2.3.9. HBV Epidemiyolojisi

2.3.9.1. Bulaşma Yolları

HBV parenteral ve perinatal yolla, perkutan ve mukazal temas eden infekte kan ve sıvılarla ayrıca infekte kişiyle cinsel ilişki yoluyla da bulaşmaktadır (93).

Transplantasyon, perinatal ya da postnatal anne sütü aracılığı ile de bulaşma olabilir. HBV'nin tek önemli rezervuarı insan olduğundan dolayı yayılmasında taşıyıcılık kavramı oldukça önemlidir. Ayrıca akut infeksiyon geçirmekte olan bireylerin ve kronik hastaların vücut sıvıları ve kanları, bulaştırmada oldukça önemli rol oynar (11, 166).

En sık karşılaşılan bulaş türü, doğum esnasında infekte salgılar ve kan aracılığı ile bulaş gerçekleşmektedir. HBV bulaşması aynı ev içinde, yakın yaşama koşullarına sahip bireyler arasında da olabilmektedir. Bunlara ek olarak idrar, ter, tükürük, feçes, gözyaşı,

sinoviyal sıvılar, vajinal salgılarda bulunması bu yollarla da bulaşmanın olabileceğini düşündürmektedir (11, 93).

2.3.9.2. Türkiye’de HBV İnfeksiyonu

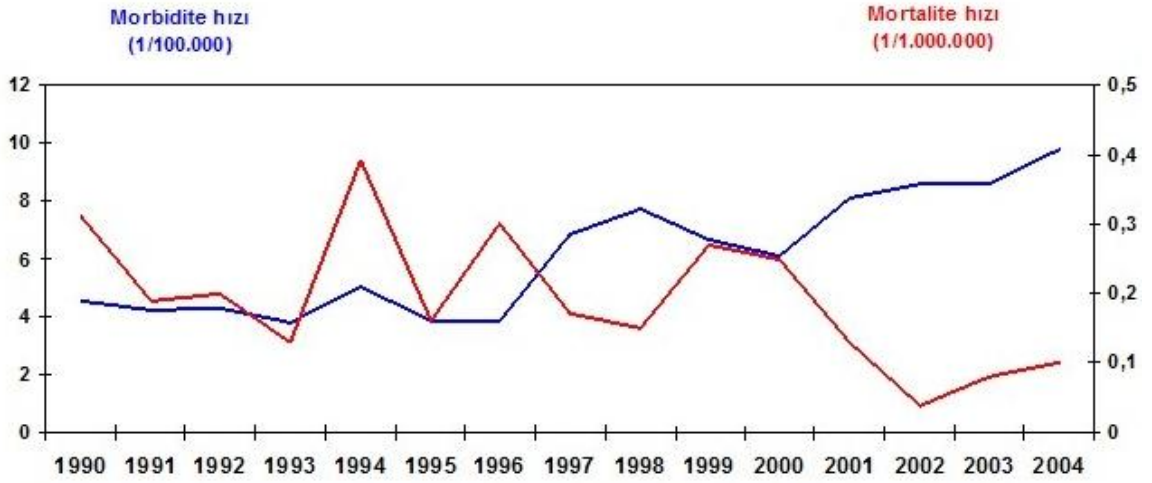
Ülkemizde 1990 yılından itibaren hepatit B’li vaka ve ölüm hızları verileri tespit edilerek kayıt altına alınmaya başlanmış 2005 yılına kadar olan kayıtlar rapor halinde Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanmıştır. Raporda her yıl hepatit B’li vaka sayısında ve hastalığın morbidite hızında artış olduğu belirtilirken mortalite hızının ise azaldığı belirtilmiştir. 2005 yılından itibaren hastalık bildirimleri standart vaka tanımları ile yapılmaktadır (167, 168).

Çizelge 2.1. Hepatit B vaka ve ölüm sayıları (Türkiye 1990-2004) (167)

Yıllar	Yıl Ortası Nüfus	Vaka Sayısı	Morbidite Hızı (100.000)	Ölüm Sayısı	Mortalite Hızı (1.000.000)
1990	57.582.446	2.620	4,55	18	0,31
1991	57.736.288	2.455	4,25	11	0,19
1992	59.088.101	2.551	4,32	12	0,20
1993	60.384.474	2.276	3,77	8	0,13
1994	61.779.288	3.099	5,02	24	0,39
1995	63.206.510	2.423	3,83	10	0,16
1996	62.727.000	2.435	3,88	19	0,30
1997	63.745.000	4.343	6,81	11	0,17
1998	64.786.000	5.003	7,72	10	0,15
1999	65.819.000	4.362	6,63	18	0,27
2000	67.844.903	4.115	6,07	17	0,25
2001	69.081.716	5.578	8,07	9	0,13
2002	70.415.064	5.813	8,26	3	0,04
2003	71.772.711	5.206	7,25	6	0,08
2004	71.152.000	6.951	9,77	7	0,10

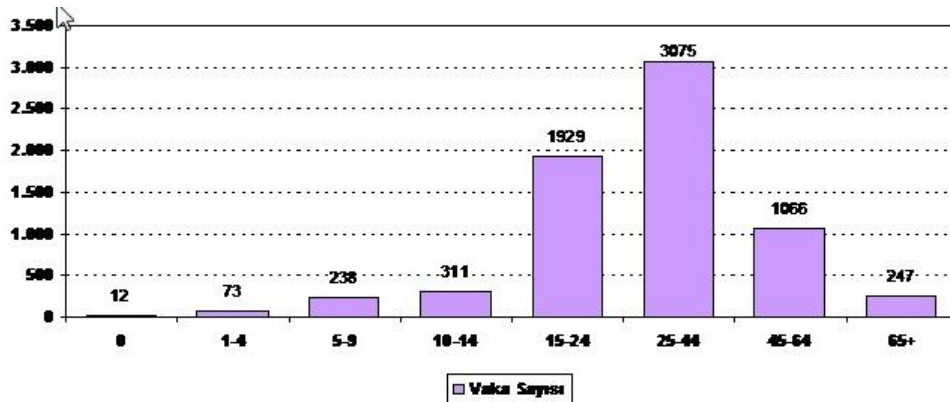
1990 Yılına kadar Hepatit A ve B birlikte bildirildiğinden, veriler 1990 ve sonrasını kapsamaktadır. Vaka ve ölüm sayıları rutin bildirim sisteminden elde edilmiştir. Hızların hesaplanmasında kullanılan nüfuslar Devlet İstatistik Enstitüsü 2000 yılı nüfus sayımına göre yapılan projeksiyonlardır.

Çizelge 2.2. Hepatit B morbidite ve mortalite hızları (Türkiye 1990-2004) (167)



Ayrıca rapora göre, hepatit B vakalarının yaş gruplarına göre dağılımı kapsamında en yüksek vaka oranına 25-44 yaş grubunun sahip olduğu görülmektedir. Ülkemizin bulunduğu bölge hepatit B virüs varlığı kapsamında endemik (%2-8), orta düzeyli bir bölgedir ve hepatit B yüzey antijeni taşıyıcılığı % 4-10 seviyesinde olduğu bildirilmektedir (169).

Çizelge 2.3. Hepatit B vakalarının yaş gruplarına göre dağılımı (Türkiye 2004) (167)



2.3.9.3. Dünyada HBV İnfeksiyonu

HBV'nin sebep olduğu ve potansiyel olarak yaşamı tehdit altında tutan bir karaciğer enfeksiyonu olan hepatit B insanlarda en çok yaygın olan viral enfeksiyonlar arasındadır. HBV dünya üzerinde ciddi bir sağlık sorunu oluşturmakla birlikte viral hepatitler arasından en ciddi sorun oluşturanıdır. Dünyada 2 milyar insan (dünya nüfusunun 1/3'ü) HBV ile enfekte olmakla birlikte bu enfekte kişilerin yaklaşık 240 milyonu kronik karaciğer problemi yaşamaktadır (9, 10).

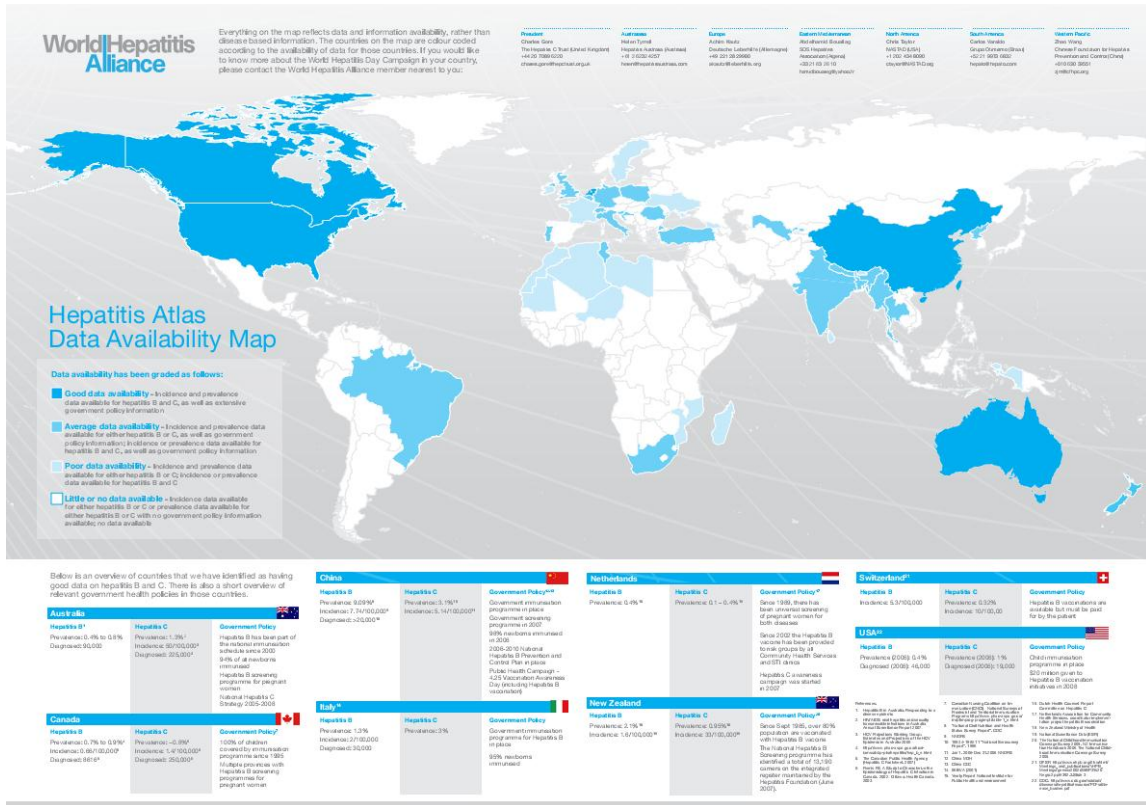
Her yıl ortalama 600.000 (0,5 ile 1,2 milyon) kişi ise HBV'nin meydana getirdiği çeşitli sonuçlarla hayatını kaybetmekle birlikte ölüm oranı temelinde hastalıklar arasında 10 uncu sıradadır. Ayrıca karaciğer nakilleri sonucunda oluşan hastalıkların % 5-10'undan da HBV sorumlu tutulmaktadır (9, 11).

Kronik enfeksiyon oranı erkeklerde kadınlara göre daha fazladır. Çin ve Asya'nın diğer alanlarında endemik olan HBV ile bu bölgelerde yaşayan insanların çoğu çocukluk çağında enfekte olmaktadır. Yetişkin popülasyonun %8-10'u ise kronik olarak enfektedir. Bu bölgelerde HBV'ye bağlı olarak gelişen karaciğer kanserinden ölüm, erkek popülasyonunda en çok ölümlü sonuçlanan kanserler arasında ilk üç sırada yer almakla birlikte, kadın popülasyonunda ise HBV ile infekteliği taşımak kansere en çok yol açan durumdur (9).

Yüksek endemisiteli ülkelerde (Hindistan ve Japonya dışındaki kalan birçok Asya ülkesi) HBsAg pozitifliği %8'in üzerindedir. Bu bölgelerde hayat boyunca HBV ile karşılaşma riski % 60'tan fazladır. HBV bulaşı sahra-altı Afrika'da kadın ve erkeklerde neredeyse aynı iken kronik enfeksiyon oluşma oranı erkeklerde daha yüksektir (170).

Asya-pasifik, dünyadaki tüm HBV taşıyıcılarının yaklaşık %75'inin yaşadığı yüksek endemisiteli bir bölgedir. Dünya nüfusunun %45'i yüksek HBV oranına sahip olan bu bölgede yaşamaktadır. Yüksek oranda HBV kronik enfeksiyonları Amazonlarda, Doğu Avrupa'nın güney kesimlerinde ve Orta Avrupa bulunur. Orta Doğu ve Hint alt bölgelerinde, genel nüfusun yaklaşık % 2-5 kronik olarak enfektedir. Orta endemisiteli ülkelerde (Kuzey Afrika ülkeleri, Ortadoğu ülkeleri, Türkiye'nin de içinde bulunduğu

Akdeniz havzası, doğu Avrupa ve Rusya) dünya nüfusunun % 43'ü yaşamakta ve HBsAg pozitifliği % 2 -7, HBV ile karşılaşma riski ise % 20-60 oranındadır. Düşük endemisiteli ülkelerde dünya nüfusunun % 12'si yaşamakta ve HBsAg pozitifliği % 2'nin altındadır. Bu bölgelerden olan Batı Avrupa, Kuzey Amerika'da ve Avusturya nüfusun % 1'den azı kronik olarak infektidir (9, 10).



Şekil 2.6. Dünya Hepatit haritası (177)

2.3.10. HBV Patogenezi

HBV'ü sitopatik değildir bu sebeple virüsün oluşturduğu infeksiyonda karaciğerde meydana gelen hasarda konağın immün yanıtı viral faktörlerden daha fazla rol oynar (13, 93, 171).

HBV'nin konak hücreye girişinin önlenmesi ve serbest haldeki virüs partiküllerinin nötralizasyonu için antikor üretimi önemli bir aşamadır. Virüsün zarf komponentlerine karşı antikor üretimi infeksiyondan çok önce başlamasına rağmen ilk aşamada yeterli seviyede virüs replikasyonu gerçekleşmemesi sebebiyle zarf antijeni yetersizliğinden dolayı oluşan antikorların tanımlanması zor olmaktadır. Virüsün konak hücresine invazyonu öncesinde antikor üretiminin yeterli seviyede aktive olması gerekmektedir. Böylece virüs partiküllerinin hücreden hücreye yayılması engellenebilir. Hücre içerisinde virüs eliminasyonu ise Sınıf I insan lenfosit antijen (HLA-I) sunuculuğu temelinde CD8+ sitotoksik T lenfositleri (CTL) ve infeksiyon bölgesindeki diğer spesifik olmayan efektör hücreler ile yapılmaktadır (171).

Akut infeksiyon esnasında HBcAg, HBeAg ve HBsAg proteinlerine karşı güçlü CD4+ T hücre yanıtı gelişmektedir. Bu esnada viral temizlik için, viral zarf, polimeraz ve kor protein epitoplarına karşı CD4+ T hücrelerinin yanı sıra CTL yanıtı da oluşur ve bu yanıt virüsün temizlenmesinde önemli rol oynar (93, 172).

Karaciğer gibi solid organlarda, CTL'lerin direk infekte hücrelere ulaşması sıkı hücre yapısından dolayı zordur. Bu sebeple sitokin üretim adaptasyonu gelişmiştir. Direkt olarak HBV replikasyonunun inhibisyonu sitotoksik T hücrelerinden salınan sitokinlerle mümkündür (93).

HBV DNA'sının hücre içinden temizlenmesi etkin olarak antiviral sitokinler aracılığı ile gerçekleştirilir. Bu sitokinleri üreten hücreler ise doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi içinde yer alan tümör nekroz faktör (TNF α), interferon alfa veya beta (IFN α - β) gibi hücrelerdir (171).

Hücre bazında CTL'ler tarafından tanımlanan HBV peptidlerine karşı üretilen sitokinler sayesinde viral DNA düşüşü yaşanır. Ardından infekte hepatositlerde sırasıyla

apoptozis ve nekroz ile sitolitik bir biçimde immün yanıt devam eder. Bu esnada serumdaki alanin aminotransferaz (ALT) düzeyi yükselir. Bu şekildeki işleyiş döngüsü bir yandan karaciğer hasarı oluştururken diğer yandan da virüsün kontrolünü sağlamaktadır. Çeşitli antijen non-spesifik inflamatuvar sitokinleri sitotoksik T hücreleri salgılar ve bunları karaciğerde biriktirir. Böylece nekroinflamasyona yönelen bir aşamayı başlatır (13).

KHB'li hastalarda virüs replikasyonu önlenemez ve kontrolü sağlanamaz. Genel olarak bu hastalarda HBV-spesifik CD4+ T hücre ve CTL yanıtı saptanamamaktadır. Bu durumda sitokin üretilmemekte ve sonuç olarak sitokin dengesizliği oluşmaktadır. Sonuç olarak immün yanıt zayıflamakta ve bu durumun getirisi olarak da infekte hücrelerde, yüksek viral antijen yoğunluğu oluşmaktadır. Hücrenin bu duruma tepki göstermesi sonucu kalıcı enfeksiyon başlamaktadır (171).

2.3.10.1. Klinik Bulgu ve Belirtiler

2.3.10.1.1. Akut enfeksiyon

Vücudun HBV ile karşılaşılmasının ardından, inkübasyon periyodu genelde 6 hafta ile 6 ay arasında değişkenlik gösterir. Asemptomatik enfeksiyondan, fulminan hepatite kadar değişen yelpazedeki bir klinik aşamada seyreder. Akut HBV enfeksiyonunda (AHB) 3-7 gün kadar süren başlangıç sendromları halsizlik, karın ağrısı, bulantı, iştahsızlık ve kusma gibi spesifite göstermeyen belirtiler şeklindedir. Sarılık belirtisiyle birlikte bazı hastalarda görülen serum hastalığına benzeyen ateş, deri döküntüleri ve artrajji/artrit şeklindeki şikayetler gerileyip kaybolurken iştahsızlık, halsizlik gibi yakınmalarda ağırlaşma gözlenir (173).

AHB dönemi inkübasyon periyodu, preikterik faz, ikterik faz ve konvelasan dönem şeklinde 4'e ayrılmaktadır (174):

- İnkübasyon periyodu (semptom başlangıcı): Ortalama 75 gün (40-150 gün arasında değişebilmektedir) olan bu dönemde biyokimyasal laboratuvar test sonuçları normal değerlerde olmakla birlikte belirgin semptomlar kaydedilmemiştir. Fakat, virüsün replikasyonunun başlamasıyla beraber serumda HBsAg görülür ve bu süreci 1-3 hafta içinde HBeAg ve HBV DNA'nın saptanabildiği aşama izler. Genellikle bu belirteçlerin titreleri yükselerek, semptom başlangıcı sonrası en tepe seviyeye ulaşır.

- Preikterik faz: Genellikle 3-7 gün içinde sona eren bu fazda iştahsızlık, halsizlik, mide bulantısı gibi semptomlar spesifiktir. HBsAg, HBeAg ve HBV DNA hala saptanabilmektedir. Serumdaki aminotransferaz aktivitesinde yükseklik saptanır. Semptomların başlamasından kısa bir süre önce HBcAg'ye karşı antikor oluşumu görülür ve artan bir titreye sahiptir. İmmün yanıt ilk olarak immunoglobulin M (IgM) ile başlar. Anti-HBs ve anti-HBe bu fazda görülmektedir. AHB semptomlarına sahip bütün hastalarda anti-HBc (IgM ve IgG) titresi saptanabilir düzeydedir.

- İkterik faz: AHB tanısı genel olarak bu fazdaki belirtiler ile konulur. Bu fazın başlangıcında, idrar renginin koyulaşması ve sarılık semptomları görülür. En önemli belirtileri yorgunluk ve iştahsızlık olmakla birlikte bu belirtileri kaşınma, döküntü, karın ağrısı, ishal, mide bulantısı ve kusma şeklindeki belirtileri izler. Bu fazda 2-10 kilo kaybı tipiktir. Kaşınma ve soluk renkte görünümündeki dışkı oluşumu genellikle sarılık başlangıcından sonra görülür. Hasta serumlarında anti-HBc ve anti-HBc IgM görülmektedir ve anti-HBc IgM varlığı AHB tanısı için spesifik ve güvenilir bir belirteçtir. Bu dönemde anti-HBe oluşumu görülebilir, ancak genellikle titresi düşüktür.

Klinik sarılıkla birlikte ikterik faz ortalama 2-3 hafta içinde(birkaç günden birkaç aya kadar devam edebilir) etmekle birlikte getirdiği belirtilerle birlikte son bulur. Bu fazda serum aminotransferaz aktivitesi sürekli olarak artış gösterken aspartat aminotransferaz (AST) aktiviteleri normal limit değerlerinin 10 ila 50 katı kadar artabilmektedir (173, 174).

Klinik semptomların başında hastaların çoğunluğunda (% 90) HBsAg hala pozitifdir. Genellikle konvelesan dönemde daha hafif devam etmekle birlikte bu belirtecin pozitifliği semptomların görüldüğü dönem boyunca sürekli eder. Buna karşın, HBV DNA ve HBeAg, semptomların görülmeye başladığı dönemde henüz görülemeyebilmektedir.

Bu belirteçlerin temizlenmesi, infeksiyonun konak tarafından tanımlandığı, olumlu bir serolojik göstergedir (174).

Sıklıkla AHB'de ilk 8 haftasında hastalık seyrinde daha geniş karaciğer nekrozu gelişmesinin sonucu olarak karaciğer sentez, salgı ve detoksifikasyon fonksiyonlarında ileri derecede bozukluk gelişebilir ve bu klinik tablo “fulminan hepatit” olarak tanımlanır. Belirgin karın ağrısı, ani ateş yükselmesi ve sarılığı takiben şuur bulanıklığı ve derin koma ile hepatik ensefalopati gelişir. Bu klinik tabloda ölüm oranı % 70-90'dır (93).

2.3.10.1.2. Kronik infeksiyon

Olguların bir kısmında HBV'nin karaciğerden temizlenmesi başarılmaz. Kanda HBsAg pozitifliğinin altı ayı aşması durumunda bu olgularda kronik infeksiyondan kuşkanılması gerekir (173).

KHB infeksiyonu artarda gelen 4 dönem içerisinde gelişir. Bunlar; immün tolerans dönemi, immün yanıt dönemi, immün kontrol dönemi ve reaktivasyon (HBeAg negatif KHB) dönemidir (173). Her hasta bu fazlardan geçmez ve fazların süresi hastadan hastaya değişkendir (14, 173, 175).

-İmmün tolerans fazı: Özellikle yeni doğan veya erken çocukluk döneminde HBV ile karşılaşmış olanlarda belirgin bir şekilde gözlenmektedir. HBeAg, HBsAg ve HBV DNA pozitifdir. Genellikle hastalar asemptomatik ve yüksek viral yüke (2×10^6 - 2×10^7 IU/ml) sahiptir. Bu bulgular viral replikasyon hızının yüksekliğini yansıtır. ALT düzeyleri ve karaciğer histolojileri normaldir (173, 176, 177).

Çizelge 2.4. KHB infeksiyon dönemleri (14)

İnfeksiyon dönemi	Serum			
	HBsAg	HBeAg	HBV DNA	ALT
İmmün tolerans fazı	+	+	↑↑↑	Negatif
İmmün yanıt fazı	+	+(-)	↑↑	↑↑↑
İnaktif dönem	+	-	-	Negatif
Reaktivasyon dönemi	+	-	↑	Negatif/ ↑↑↑

- İmmün temizlik fazı: Bu dönemin klinikteki ifadesi HBsAg (+) kronik B hepatitidir. Bu devrenin devamı durumunda karaciğerdeki inflamasyon ve fibrotik süreç devam ederek hastalık karaciğer sirozuna kadar ilerleyebilir İmmün tolerans fazından yıllar sonra, virüse gösterilen tolerans kırılmaya başlar. Bu faz, replikatif immün tolerans fazından non-replikatif faza geçildiği dönem olup HBeAg'den anti-HBe pozitifliğe geçildiği dönemdir. Anti-HBe cevabının oluşması ile viral replikasyon genellikle kesilir ve karaciğer hastalığı inaktif hale geçer. Oluşan immün yanıtın neticesinde karaciğer hücre hasarı, bununla ilişkili biyokimyasal bulgular (ALT, AST yüksekliği) ve karaciğer biyopsisinde aktif inflamasyon bulguları ortaya çıkar (173, 178).

- İnaktif faz: İmmün yanıt döneminin sona ermesiyle birlikte hastalar inaktif döneme geçer. Bu dönemde HBV DNA (-) veya düşük düzeylerde bulunur. Hastaların

bazılarında bu fazın ardından bir daha aktif infeksiyon formları gelişmez. Eğer immün cevap döneminde ağır bir karaciğer hasarı meydana gelmişse virolojik aktivitenin bitmesinin ardından histopatolojik düzelme ve ALT seviyesinin de normale dönmesi ile tipik bir inaktif taşıyıcılık örneği oluşur. İnaktif taşıyıcılarda zamanla anti HBs pozitifliği gözlenebileceği gibi HBsAg'nin negatifleşmesi gibi hastalığın yeniden aktif formlara geçmesi de mümkündür. Bu dönemin özelliği ALT düzeylerinde dalgalanmalar gözlenebilmesidir (173).

- Reaktivasyon fazı: Aktif replikasyon ile pasif KHB döneminin aktif hale geçtiği fazdır. Bu fazda HBV DNA sıklıkla konak kromozomal genomuna entegre olur. HBsAg HBV DNA entegre olmuş konak hücreleri tarafından üretilmeye devam edilir. Bir kısım hasta inaktif taşıyıcı olarak kalırken, bir kısım hastada (% 12-14) ise HBV'nin prekor ve kor promotör gen bölgelerinde mutasyon geçirmesi ile HBeAg (-) KHB gelişir (96, 184). Reaktivasyon fazı sıklıkla HBsAg'nin negatifleşmesini takiben oluşur. Reaktivasyona genellikle semptomların yeniden görülmesi ve ALT ve AST aktivitelerindeki yükselme eşlik eder. KHB infeksiyon seyri karaciğer hasarının şiddetine bağlıdır (14, 174).

2.3.11. HBV ve Hepatosellüler Karsinoma

Primer karaciğer hücrelerinin malign transformasyonu sonucu gelişen nodüllere veya kütleyle HSK denir. HSK belirli boyutlara ulaşmadan ortaya çıkmaz. Belirti ve bulgular kendinden çok temelinde yatan kronik karaciğer hastalığına aittir. Virüslerle ilişkili HSK'da hemen her zaman zeminde siroz vardır (179).

HSK ve siroz oluşumu Hepatit B infeksiyon varlığında doğal seyirde görülebilir. HBV kronik taşıyıcıları normal bir kimseye oranla HSK gelişimi yönünden daha büyük risk altındadır (13).

Dünya üzerindeki HSK olgularının %53'ünün HBV ile infeksiyon ilişkisi kurulmuştur. HSK gelişim aşamaları, KHB hastalarında tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalarda vücudun HBV ile karşılaşması sonucu oluşturduğu karşı immün

sistem yanıtının şiddeti, konağın HSK'ya yatkın olması gibi genetik faktörler, HBV replikasyon oranının yüksek olması, HBV genomunda meydana gelen mutasyonlar ile ilişkili olabileceği vurgulanmaktadır (14, 15).

Kronik infeksiyonda etkili olmayan bir immün yanıt ana onkogenik faktör olabilmektedir. Aynı T-hücre yanıtı farklı etkilere sahip olabilmektedir. Şöyle ki, T-hücre yanıtı olması gerektiği seviyede güçlü ise, karaciğer HBV'den eradike edilebilir. Eğer eradikasyon gerçekleşmezse, HBV'nin pro-karsinojenik etkisi nekrotik inflamatuvar hastalık ile indüklenebilmektedir. Bu yolla immün sistem aracılı kronik karaciğer inflamasyonu, hücre ölümü ve daha sonra hücre proliferasyonu ile genetik değişiklikler ve kanser oluşma riski ortaya çıkmaktadır (15).

HBV DNA integrasyonu ie kromozom 17 üzerinde bulunan tümör süpresör genlerin translokasyonu integrasyonla olabilir ve p53, HBV'nin rol oynadığı tümör gelişiminde etkili olabilir (180).

Coğrafik olarak HSK'da, HBV'nin hiperendemik ya da endemik olduğu bölgelerle tümör oluşumunun yüksek olduğu bölgeler paralellik göstermekle birlikte HSK insidansının düşük olduğu bölgelerde HBV taşııcılığının da düşük olması dikkat çekicidir (181).

Ülkemiz HBV sıklığı açısından orta derece endemik bölgeler arasındadır ve yaklaşık 3 milyon kişinin HBV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir (182). European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)'nin Eylül 2010'da hepatit B'ye ilişkin teknik raporunda Türkiye'de genel popülasyonda hepatit B prevalansı bölgelere göre %2-8 arasında bildirilmiştir. Siroz hastalarında HBsAg prevalansı %64, hepatosellüler karsinoma vakalarında HBsAg prevalansı %54 olarak bildirilmiştir. Bu rapora göre Avrupa ülkeleri ile kıyaslandığında genel popülasyonda hepatit B prevalansının en yüksek olduğu ülkelerden biri Türkiye'dir (183). Ülkemizde yapılan çalışmalarda hepatit B prevalansının batıdan doğuya doğru gidildikçe arttığı, Eskişehir, Antalya, Adana, Elazığ, Sivas ve Erzurum'da yüksek oranlarda bulunduğu, Diyarbakır'da HBsAg pozitiflik oranının %10'lara ulaştığı bildirilmektedir. Kan donör çalışmalarına göre HBsAg pozitifliği ülkemizde yıllar içinde

azalma göstermektedir (%5,2'den %2,97'ye). HBV'nin 8 genotipi içinde Türkiye'de genotip D'nin birçok çalışmada %100 oranında bulunduğu bildirilmektedir (184, 185).

Türkiye'deki HSK insidansı, 2003 yılı Sağlık Bakanlığı verileri temelinde, 0.83/100.000 oranındadır (186).

Dünya genelinde HBV taşıyıcısı sayısı yaklaşık 360 milyondur ve yine bu taşıyıcıların yaklaşık olarak $\frac{1}{4}$ 'ünde HSK oluşumu gözlenmektedir. Her yıl, kronik infekte olan kadınlarda 120-178/100.000 ve erkeklerde 340-804/100.000 oranında tümör oluşum insidansı raporlanmaktadır (181).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Çalışmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalına 2011 yılından itibaren tedavi ve kontrol takip amacıyla başvuran 54 kronik HBV hastası, HBV DNA pozitif siroz hastası ve HSK hastasından temin edilen kan örneği ile Adana Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Seyhan Uygulama Merkezi'ne 2011 yılından itibaren başvuran 13 KHB tanısı konmuş siroz ve HSK hastasından temin edilen toplam iki merkezdeki 67 hastadan temin edilen örnekler kullanılmıştır. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kan Merkezi'ne başvuran 33 gönüllü kan bağışçısının kan örneği kontrol grubu olarak çalışmada yer almıştır.

Çalışma için demografik bilgileri içeren bir form hazırlandı. Hastanın yaşı, cinsiyeti, kullandığı medikal ilaç, karaciğer enzimleri, ailesinin kanser geçmişi ve yaşam biçimi hakkında kısa bilgiler alındı.

Bu tez çalışmasına, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Etik Kurul Başkanlığı'nın 09.02.2012 tarihli ve 2012/80 sayılı kararı ile 'Etik Kurul Onayı' aldıktan sonra başlanmıştır.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler:

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- -80°C Soğutucu (Heto Ultrafreeze)
- Buzdolabı (Indesit)
- Derin Dondurucu (Uğur)

- 8 kanallı pipet (Gilson)
- 16 kanallı pipet (Gilson)
- Dynamic Array 96.96, (Fluidigm)
- Yüksek kapasiteli RT-PCR Sistemi (Fluidigm, Biomark, USA)
- LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied science)
- Santrifüj (Sigma k-15-1, Almanya)

3.2.2. Kullanılan Malzemeler

- High Pure miRNA Isolation Kiti; Katalog no: 05080576001 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Tüp (2×50), toplama tüpleri (2×50)
- 1.5 ml.lik ependorf (DNase, RNase Free)
- 0.5 ml.lik ependorf (DNase, RNase Free)
- 96 Well PCR Plate, Katalog no: 1402-9400 (USA Scientific)
- PCR Plate Film, Katalog no: 2921-7800 (USA Scientific)
- DNA süspansiyon buffer
- TaqMan PreAmp Master Mix, 2X, Katalog no: 4391128 (Applied Biosystem)
- MegaPlex PreAmp Primers (10X), Human Pool A v2.1, Katalog no: 4444750 (Applied Biosystem)
- MegaPlex PreAmp Primers (10X), Human Pool B v3.0, Katalog no: 4444750 (Applied Biosystem)
- 8li strip tüp
- 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)
- RNase Inhibitor
- DNase, RNase Free Water
- MgCl₂
- Sample&Assay LoadingKit, Katalog no: 85000802 (Fluidigm)
- RNU48

Yapılan çalışma üretici firmanın (Fluidigm PN: 100-1616 B2) önerdiği yol izlenerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. MikroRNA Analizi:

3.2.3.1. Serum Eldesi:

Kan örnekleri 10µl'lik normal tüplere alınarak en geç 2 saat içerisinde işleme alındı.

1. Tüpler 15 dk süreyle 4.000 rpm de santrifüj edildi.
2. Santrifüj işleminin ardından tüpler sarsmadan dikkatlice santrifüjden çıkarıldı. Tüpün üst kısmında toplanan serum dikkatlice temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
3. Mikrosantrifüj tüpleri ait oldukları hastaların bilgileriyle numaralandırıldıktan sonra -80°C de işleme alınacağı güne kadar beklemesi amacıyla dondurucuya kaldırıldı.

3.2.3.2. MikroRNA İzolasyonu:

MikroRNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılarak toplanılan serumlardan miRNA izolasyonu yapıldı.

1. Serum örneklerinden 150µl'lik kısım DNase, RNase free mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
2. Her bir mikrosantrifüj tüpüne 312µl'lik Binding buffer ve 200 µl Binding Enhancer eklenerek karıştırıldı.
3. Filtreli tüp toplama kabına aktarılan örnekler 1 dk süreyle 13.000g de santrifüj edildi ve ardından toplama kapları atıldı.
4. Filtreli tüpler temiz toplama kaplarına alınarak üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi ve 30 sn süreyle 13.000 g de santrifüj edildi. Toplama kapları atıldı.
5. Filtreli tüpler temiz toplama kaplarına alındı ve üzerine 300 µl Wash Buffer eklendi. Bu işlemi takiben önce 30 sn ardından 1 dk olmak üzere 13.000 g'de santrifüj edildi.
6. DNase, RNase free mikrosantrifüj tüplerine aktarılan filtreli tüplerin üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi. Örnekler 1dk süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından 13.000 g de 1 dk santrifüj edildi.
7. Bu işlemler sonucunda elde edilen total RNA bir sonraki işleme kadar -80°C de saklandı.

3.2.3.2.1. MikroRNA Taqman cDNA Protokolü:

1. RNA örnekleri -80°C den çıkarıldı ve erimeye bırakıldı. Ardından 30 sn santrifüj edilerek cDNA protokolü hazırlanana kadar soğuk blok üzerinde bekletildi.
2. Aşağıdaki karışım hazırlanarak temiz 8'li strip tüplerin (0.3ml) her bir kuyusuna 42 µl olarak pipetlendi.

Karışım: (Kullanılan Kit: Applied Biosystems (PN 4444750, 4366596)

• MegaPlex RT Primers _(10X) A _(Applied Biosystems, PN 4401009) veya B _(Applied Biosystems, PN 4401010)	60.00 µl
• dTTP'li dNTP (100mM)	15.30 µl
• MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/ µl)	115.00 µl
• 10X RT Buffer	61.30 µl
• MgCl ₂ (25mM)	69.00 µl
• RNase Inhibitor(20U/ µl)	7.60 µl
• Nükleazlardan arındırılmış su	16.80 µl
<hr/>	
Toplam:	345.00 µl

- 8'li strip tüplere aktarılan bu karışımdan 3 µl, 8 kanallı pipet kullanılarak 96 kuyuluk PCR plate'e dağıtıldı.
- RNA örneklerinin bulunduğu 96 kuyuluk plate, 8 kanallı pipet 2 µl'ye ayarlanarak RNA örnekleri alındı ve cDNA karışımları üzerine eklendi. 5-6 kez pipetajlanarak RNA örneklerinin cDNA karışımı ile iyice karışması sağlandı.
- Plate'in yüzeyi yapışkanlı film ile sağlam bir şekilde örtülerek 1 dk santrifüj yapıldı ve ardından 5 dk süreyle inkübasyon için buz üzerine bırakıldı.
- miRNA TaqMan cDNA Thermal Protokolü üstten ısıtma özelliği olan bir thermal cycler da aşağıda bahsedilen programa göre çalıştırıldı.

-miRNA TaqMan cDNA Termal Program

- | | | |
|---------|--------|------------|
| • 16 °C | 120 sn | } 40 döngü |
| • 42 °C | 60sn | |
| • 50 °C | 1 sn | |
| • 85 °C | 300sn | |
| • 4 °C | ∞ | |

3.2.3.2.2. MikroRNA TaqMan PreAmplifikasyon Protokolü:

1. cDNA örneklerinin bulunduğu 96 kuyuluk plate -80°C 'den çıkarılarak erimeye bırakıldı ve ardından 30 sn santrifüj edildi.
2. 8 kanallı pipet kullanılarak $2\ \mu\text{l}$ cDNA örneği yeni bir 96 kuyuluk plate aktarıldı. Üzerine $8\ \mu\text{l}$ DNA Suspension Buffer eklenerek pipetaj yapıldı.
3. PCR karışımı 96 örnek (95 cDNA örneği+1 Negatif kontrol) için aşağıdaki reaktifler hazırlandı ve 8'li strip tüpün her bir kuyucuğuna $62\ \mu\text{l}$ pipetlendi

Kullanılan Kit: Applied Biosystems (PN 4444750, 4391128)

-TaqMan PreAmpMaster Mix,_{2x}(Applied Biosystems, PN 4391128) 287.50 μl

-MegaPlexPreAmpPrimers,_(110X)(Applied Biosystems, PN4401009- 57.50 μl

PN4401010)

Toplam: 345.00 μl

4. 8 kanallı pipet $3\ \mu\text{l}$ 'ye ayarlanarak yukarıdaki karışım temiz bir 96 kuyuluk plate'e aktarıldı. 96 kuyucuğun her birine işlem tekrarlandı.
5. Dilüe edilmiş cDNA örnekleri az önce hazırlanan PCR karışımı üzerine $2\ \mu\text{l}$ şeklinde 8 kanallı pipet kullanılarak aktarıldı. Pipetaj yapılarak iyice karışmaları sağlandı.
6. Plate'in üzerine yapışkanlı film ile kaplanarak 1 dk süreyle santrifüj edildi ve ardından 5 dk süreyle inkübasyona bırakıldı.
7. miRNA TaqMan PreAmp Thermal Protokolü aşağıda belirtildiği şekilde üstten ısıtma özelliği olan bir thermal cycler da çalıştırıldı.

-PreAmp Thermal Program

- 95°C 600 sn
 - 55°C 120 sn
 - 72°C 120 sn
 - 95°C 15 sn
- } 18döngü

- 60°C 240 sn
- 99.9 °C 600 sn
- 4°C ∞

8. PreAmplifikasyon sonunda 2 µl PreAmp cDNA temiz bir 96 kuyuluk plate'e aktarıldı. Üzerine 18 µl DNA suspansiyon Buffer koyularak 1:10 olacak şekilde sulandırıldı.
9. PreAmp cDNA'lar aynı gün kullanılacaksa 4°C'de, kullanılmayacaksa -80°C'de saklandı.

Bu protokol Pool A ve B preamp primerleri için ayrı ayrı olmak üzere cDNA A ve B olarak iki panel şeklinde uygulanmıştır.

-miRNA analizi:

cDNAlar Dynamic Arrayler üzerinde 24 miRNA için Yüksek Kapasiteli Real-Time PCR sistemi (Fluidigm, Biomark, USA) kullanılarak analiz edildi.

3.2.3.3. Dynamic Array 96.96'nın Hazırlanması:

Bir adet Dynamic Array 96.96 olarak paketi açıldı. Üst ve alt kısımlarında bulunan küçük hücrelere her hücreye bir enjektör olmak koşuluyla Control Fluid'lar yüklendi. Dynamic Array 96.96 yı IFC Controller'a yerleştirildi ve PRIME edildi. Bu işlem 20 dk kadar sürmektedir, bu süre esnasında aşağıdaki işlemler yapıldı:

3.2.3.3.1. Örnek ve PCR Karışımının Hazırlanması:

1. Aşağıdaki karışım 96 örnek için (95 cDNA örneği+1 Negatif kontrol) hazırlandı (ölü hacimler hesaba katılmıştır).

-TaqMan Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG)	490.00 µl
-GE Sample Loading Reagent (Fluidigm, PN85000746)	49.00 µl
Toplam:	539.00 µl

2. Yukarıdaki karışımdan 8'li srip tüpe her bir kuyucuğa 65 µl olacak şekilde pipetlendi.
3. Temiz bir 96 kuyuluk plate alındı ve yukarıdaki karışımdan 3.85 µl her bir kuyucuğa pipetlendi. Daha sonra 8 kanallı pipet kullanılarak 3.15 µl dilüe preamplifiye cDNA lar alınarak karışım üzerine pipetlendi. Her pipetlemede pipetaj yapılarak örneklerin iyice karışması sağlandı.
4. Bütün örnekler bu şekilde karıştırıldıktan sonra Master mix+ diluted PreAmplified cDNA nın her birinden 5 µl alarak dikkatli bir şekilde Dynamic Array 96.96 da SAMPLE şeklinde işaretli bölüme pipetlendi.

3.2.3.3.2. ASSAY Karışımının Hazırlanması:

1. Çalışmaya başlamadan önce A ve B assay plateleri, toplamda 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 aynı gün içinde kullanılacaksa 4°C'de aksi takdirde -20°C'ye kaldırıldı.
4. Dynamic Array 96.96 IFC Controller'a konularak LOAD program çalıştırıldı.

3.2.3.3.3. MikroRNA TaqMan Dynamic Array Protokolü

1. Load ve Mix işlemi bitince BioMark Data Collection software de Start'a New Run'a tıklandı. Bu arada BioMark üzerindeki ışıkların ikisininde yeşil olmasına dikkat edildi. Çünkü bu lambanın açıldığını ve cihazın hazır olduğunu gösterir. Dynamic Array 96.96 BioMark' a yerleştirildi 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 Expression'u Passive Reference bölümünde ROX ve Assay bölümünde ise Single Probe işaretlendi ve aşağıda açılan kısımdan FAM-MGB I seçildi ve Next'e tıklandı.
4. Protokol olarak GE 96.96 Standart V1 thermal protokolü seçildi ve Auto Exposure'un seçili olduğundan emin olundu ve Next'e tıklandı.
5. Start Run'a tıklayarak çalışma başlatıldı.

3.3. İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışmanın sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi Fluidigm (BioMark) Data Collection Software v.2.1.3 ile elde edilen veriler Biogazelle qbasePLUS programına aktarılarak istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistiksel hesaplamalar Mann Whitney U testi ile yapıldı ve anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak değerlendirildi.

5. BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 65 hastanın 50 (%76,92)'si erkek, 15 (%23.08)'i kadındı (Çizelge 4.1.). Hastaların tamamı 20-73 yaş grubunda idi.

Çizelge 4.1. Hastaların cinsiyete göre dağılımı

CİNSİYET	n	%
Erkek	50	76.92
Kadın	15	23.08
Toplam	65	100.0

Yapılan çalışmada; KHB, KCS, HSK ve kontrol gruplarında Pool A ve B preamp primer panellerinde belirlenen miRNA'ların ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı.

HSK ile kontrol grubu arasında yapılan belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında (Çizelge 4.2.), kontrol grubuna göre HSK hastalarında miR-223-3p azalan; miR-92a-3p, miR-122-5p ve miR-125b-5p'nin ise artan bir ekspresyon seviyesine sahip olup anlamı bir istatistiksel ilişki ($p < 0,05$) bulunmuştur. Panelde yer alan diğer miRNA ekspresyon seviyeleri ise istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0,05$) bulunmamıştır.

Çizelge 4.2. HSK/Kontrol grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması

miRNA	Karşılaştırma	Mean (HSC/Kontrol)	Ekspresyon değişimi	P (P<0.05)
miR-223-3p	HSK/Kont.	0.079/1.00	12.65 kat ↓	0.0001446
miR-92a-3p	HSK/Kont.	2.446/1.00	2.44 kat ↑	0.02434
miR-122-5p	HSK/Kont.	9.993/ 1.00	9.99kat↑	0.02778
miR-125b-5p	HSK/Kont.	1.899/1.00	1.89 kat↑	0.04186
miR-342-3p	HSK/Kont.	2.254/1.00	1.25 kat↑	0.2131
RNU48	HSK/Kont.	0.195/1.00	5.12kat↓	0.3564
miR-375	HSK/Kont.	2.430/1.00	2.43kat↑	0.3666
miR-150-5p	HSK/Kont.	1.156/1.00	1.156 kat↑	0.4361
miR-423-5p	HSK/Kont.	1.221/1.00	1.221 kat↑	0.4767
miR-10a-5p	HSK/Kont.	3.318/1.00	3.318 kat↑	0.5000
miR-223-5p	HSK/Kont.	0.198/1.00	5.05 kat ↓	0.5000
miR-206	HSK/Kont.	1.342/1.000	1.342 kat↑	0.1048

KHB ile HSK grubu arasında yapılan belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında (Çizelge 4.3.), HBV grubuna göre HSK hastalarında miR-92a-3p ve miR-423-5p'nin artan bir ekspresyon seviyesine sahip olduğu ve aralarında anlamlı bir istatistiksel ilişki ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur. Panelde yer alan diğer miRNA ekspresyon seviyeleri ise istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$) bulunmamıştır.

Çizelge 4.3. KHB/HSK grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması

miRNA	Karşılaştırma	Mean (KHB/HSK)	Ekspresyon değişimi	P (P<0.05)
miR-92a-3p	KHB / HSK	1.107/ 2.446	2.209 KAT ↑	0.02314
miR-423-5p	KHB / HSK	0.400/ 1.221	3.05 KAT ↑	0.04537
miR-150-5p	KHB / HSK	0.820/ 1.156	1.409 KAT ↑	0.1454
miR-223-3p	KHB / HSK	0.180/ 0.079	2.278 KAT ↓	0.1655
miR-125b-5p	KHB / HSK	2.852 /1.899	1.501 KAT ↓	0.1864
miR-342-3p	KHB / HSK	0.398 /2.254	5.66 KAT ↑	0.2001
miR-206	KHB / HSK	1.572 / 1.342	1171 KAT ↓	0.2983
miR-122-5p	KHB / HSK	13.771/ 9.993	1.378 KAT ↓	0.3398
RNU48	KHB / HSK	0.573/0.195	2.938 KAT ↓	0.3961
miR-375	KHB / HSK	3.513/2.430	1.445 KAT ↓	0.4811
miR-223-5p	KHB / HSK	4.234 /0.198	21.38 KAT ↓	0.6000

KHB ile kontrol grubu arasında yapılan belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında (Çizelge 4.4), kontrol grubuna göre HBV hastalarında miR-125b-5p'nin artan, miR-223-3p'nin ise azalan bir ekspresyon seviyesine sahip olduğu ve aralarında anlamlı bir istatistiksel ilişki ($p < 0.05$) olduğu bulunmuştur. Panelde yer alan diğer miRNA ekspresyon seviyeleri ise istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0.05$) bulunmamıştır.

Çizelge 4.4. KHB/Kontrol grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması

miRNA	Karşılaştırma	Mean (KHB/Kontrol)	Ekspresyon değişimi	P (P<0.05)
miR-125b-5p	KHB / Kont.	2.852 /1.000	2.852 KAT↑	0.002703
miR-223-3p	KHB / Kont.	0.180/1.000	5.55 KAT↓	0.01513
miR-423-5p	KHB / Kont.	0.400/1.000	2.5 KAT↓	0.06147
miR-122-5p	KHB / Kont.	13.771/1.000	13.771 KAT↑	0.08824
miR-206	KHB / Kont.	1.572/1.000	1.572 KAT↑	0.1267
miR-150-5p	KHB / Kont.	0.820/1.000	1.219 KAT↓	0.2427
miR-342-3p	KHB / Kont.	0.398/1.000	2.51 KAT↓	0.3,021
miR-375	KHB / Kont.	3.513/1.000	3.513 KAT↑	0.3242
miR-92a-3p	KHB / Kont.	1.107/1.000	1.107 KAT↑	0.3529
miR-223-5p	KHB / Kont.	4.234/1.000	4.234 KAT↑	0.3846
miR-10a-5p	KHB / Kont.	2.828/1.000	2.828 KAT↑	0.5000
RNU48	KHB / Kont.	0.573/1.000	1.745 KAT↓	0.5235

KHB ile KCS grubu arasında yapılan belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında (Çizelge 4.5.), KHB grubuna göre KCS hastalarında miR-150-5p'nin artan bir ekspresyon seviyesine sahip olduğu ve bu seviyenin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) olduğu bulunmuştur. Panelde yer alan diğer miRNA ekspresyon seviyeleri ise istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0.05$) bulunmamıştır.

Çizelge 4.5. KHB/KCS grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması

miRNA	Karşılaştırma	Mean (KHB/KCS)	Ekspresyon değişimi	P (P<0.05)
miR-150-5p	KHB/KCS	0.820/1.926	2.348 KAT↑	0.007031
miR-223-3p	KHB/KCS	0.180/0.072	2.5 KAT↓	0.1516
RNU48	KHB/KCS	0.573/ 0.001	573 KAT↓	0.1667
miR-206	KHB/KCS	1.572/ 0.404	3.891 KAT↓	0.2262
miR-423-5p	KHB/KCS	0.400/ 0.472	1.18 KAT↑	0.2669
miR-122-5p	KHB/KCS	13.771/ 13.377	0.971 KAT↑	0.2907
miR-125b-5p	KHB/KCS	2.852/ 2.465	1.156 KAT↓	0.3207
miR-342-3p	KHB/KCS	0.398/ 1.208	3.035 KAT↓	0.3598
miR-92a-3p	KHB/KCS	1.107/ 1.274	1.150 KAT↑	0.4689
miR-375	KHB/KCS	3.513/4.502	1.281 KAT↓	0.4726

KCS ile kontrol grubu arasında yapılan belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında (Çizelge 4.6.), kontrol grubuna göre KCS hastalarında miR-223-3p'nin azalan; miR-122-5p ve miR-125b-5p'nin ise artan bir ekspresyon seviyesine sahip olduğu ve bu seviyenin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur. Panelde yer alan diğer miRNA ekspresyon seviyeleri ise istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$) bulunmamıştır.

Çizelge 4.6. KCS/Kontrol grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması

miRNA	Karşılaştırma	Mean (KCS / Kontrol)	Ekspresyon değişimi	P (P<0.05)
miR-223-3p	KCS/Kont.	0.072/1.000	13.88 KAT↓	0.0009440
miR-122-5p	KCS/Kont.	13.377 /1.000	13.377KAT↑	0.02778
miR-125b-5p	KCS/Kont.	2.465/ 1.000	2.465 KAT↑	0.03670
miR-423-5p	KCS/Kont.	0.472/ 1.000	2.118 KAT↓	0.06586
miR-150-5p	KCS/Kont.	1.926/1.000	1.926 KAT↑	0.06777
RNU48	KCS/Kont.	0.001/1.000	1000 KAT↓	0.09091
miR-92a-3p	KCS/Kont.	1.274/1.000	1.274 KAT↑	0.3001
miR-206	KCS/Kont.	0.404/ 1.000	2.475 KAT↓	0.3013
miR-375	KCS/Kont.	4.502/1.000	4.502 KAT↑	0.3048
miR-342-3p	KCS/Kont.	1.208/1.000	1.208 KAT↑	0.4163
miR-223-5p	KCS/Kont.	5.735/1.000	5.735 KAT↑	0.4167

HSK ile KCS grubu arasında yapılan belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında (Çizelge 4.7.), panelde yer alan miRNA ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$) bulunmamıştır.

Çizelge 4.7. HSK/KCS grubu miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılması

miRNA	Karşılaştırma	Mean (HSK/KCS)	Ekspresyon değişimi	P (P<0.05)
miR-423-5p	HSK/KCS	1.167/0.451	2.587 KAT ↑	0.5
miR-92a-3p	HSK/KCS	2.411/1.254	1.92 KAT ↑	0.5
miR-150-5p	HSK/KCS	1.117/1.916	1.67 KAT ↓	0.5
RNU48	HSK/KCS	0.202/0.001	201 KAT ↑	0.5
miR-206	HSK/KCS	1.328/0.400	3.32 KAT ↑	0.5
miR-125b-5p	HSK/KCS	1.855/2.414	0.768 KAT ↓	0.5
miR-122-5p	HSK/KCS	10.065/13.445	0.748 KAT ↓	0.5
miR-375	HSK/KCS	2.451/4.547	0.539 KAT ↓	0.5
miR-342-3p	HSK/KCS	2.172/1.161	1.87 KAT ↑	0.5
miR-223-5p	HSK/KCS	0.078/0.071	1.098 KAT ↑	0.5
miR-223-3p	HSK/KCS	0.203/5.906	0.034 KAT ↓	0.5

Genel olarak çalışmada ekspresyon seviyeleri araştırılan miRNA'lara kontrol grubu ile; KHB'den başlayarak KCS ve HSK'ya geçişte istatistiksel olarak anlamlı olan ekspresyon seviyeleri Çizelge 4.8.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Kontrol, KHB, KCS ve HSK gruplarının hem kontrol grubu hemde birbirleri arasındaki belirli miRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (p>0.05: istatistiksel olarak anlamlı değil)

Gruplar	miR-125b-5p	miR-223-3p	miR-92a-3p	miR-122-5p	miR-423-5p	miR-150-5p
Kontrol/KHB	↑	↓	↑ (p>0.05)	↑ (p>0.05)	↓ (p>0.05)	↓ (p>0.05)
Kontrol/KCS	↑	↓	↑ (p>0.05)	↑	↓ (p>0.05)	↑
Kontrol/HSK	↑	↓	↑	↑	↑ (p>0.05)	↑
KHB/KCS	↓ (p>0.05)	↓ (p>0.05)	↑ (p>0.05)	↑ (p>0.05)	↑	↑ (p>0.05)
KHB/HSK	↓ (p>0.05)	↓ (p>0.05)	↑	↓ (p>0.05)	↑ (p>0.05)	↑ (p>0.05)
KCS/HSK (p>0.05)	↓ (p>0.05)	↓ (p>0.05)	↑ (p>0.05)	↓ (p>0.05)	↑ (p>0.05)	↓ (p>0.05)

5. TARTIŞMA

HBV Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirüs cinsinde yer alan, zarflı, kısmen çift sarmallı ve hepatotropik bir DNA virüsüdür. Akut ve kronik infeksiyonlara neden olur. Karaciğerde fibrozise yol açarak zaman içerisinde KCS ve ardından HSK'ye sebep olur (187). Son zamanlarda HSK ve HBV hakkında yapılan çalışmalar, miRNA'ların bu durumlarla ilişkisi olduğu ve bir biyomarkır olarak kullanılması üzerinedir (188).

Bizim yaptığımız çalışmada; 24 adet miRNA'nın ekspresyon profilleri KHB, KHB'ye bağlı olarak gelişen KCS ve HSK'lı 65 hastaya ait serum örneği ve 33 adet kontrol grubu serum örneğinde değerlendirilmiştir. Çalışmamızın amacı, hangi miRNA'ların HSK aşamasına henüz gelmemiş hastalarda HSK'nın erken tanısında kullanılabilecek prognostik markırlar olabileceğinin saptanmasıdır.

Çalışmamızda, miR-125b-5p ve miR-223-3p'nin ekspresyon seviyeleri, kontrol grubu ile KHB, KCS ve HSK'lı hastaların grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı veriler bulunmuştur. MiR-122-5p ve miR-92a-3p'nin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında ise tam olarak bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı veriler bulamamış olmamıza rağmen tartışmamızda yer verdik.

Serumlardaki ekspresyon seviyeleri ölçülen miRNA'lardan miR-125b-5p'nin gruplar açısından değerlendirilmesinde; kontrol grubu ile KHB hastalarının kıyaslanması sonucunda KHB'li hasta serumundaki ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre 2.852 kat arttığı, kontrol ile KCS hastaları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre KCS'lilerde 2.465 kat arttığı, kontrol ile HSK hastaları karşılaştırıldığında ise yine kontrol grubuna göre HSK'lilerde 1.89 kat arttığı saptandı. Bu artış seviyeleri istatistiksel olarak da ($p<0.002703$, $p<0.03670$, $p<0.04186$) anlamlı bulundu (Çizelge 4.2, 4.4, 4.6). Fakat KHB'li hastaların serumları ile KCS'li ve HSK'lı hasta serumları karşılaştırıldığında miR-125b-5p ekspresyon seviyesinin, KHB'li hasta serumlarındaki seviyesine oranla KCS'li hastalarda 1.156 kat ve HSK'lı hastalarda ise 1.501 kat azaldığı saptanmıştır (Çizelge 4.3, 4.5, 4.7). Fakat verilerin istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p<0.3207$, $p<0.1864$). KCS'li hasta serumları ile HSK'lı hasta

serumlarındaki ekspresyon seviyesi farkına bakıldığında ise 0.768 kat azalmanın HSK'lı hastalarda gerçekleştiği bulunmuştur. Fakat bu grubun da verileri istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0.5$).

Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde; 2012 yılında Jeong ve ark. (189) 16 HSK'lı ve 8 sağlıklı karaciğer dokusunda yaptıkları çalışmada hipotezlerini Sirtuin7 (SIRT7)'yi hedef alan belirli miRNA'ların HSK'da regülasyonlarının azaldığı yönünde kurmuşlardır. Bu çalışma sonunda bazı miRNA'ların HSK'da belirgin bir şekilde ekspresyon oranının azaldığını bildirmişlerdir. SIRT7 geninin ribosomal gen transkripsiyonunda rolü olduğu bilinmektedir (190). Yapılan bu çalışmada miRNA-125b'nin HSK'lı dokulardaki ekspresyon seviyesinin normal dokulara göre düştüğünü saptamışlar ve bu miRNA'nın direkt olarak SIRT7'nin süpresörü olduğunu, fonksiyonunun ise HSK tümörgenesizde SIRT7'nin anormal ekspresyonunun kontrolünü sağlayarak tümör süpresör olarak rol alması şeklinde belirtilmişlerdir. Sonuç olarak, bu çalışma grubu, miR-125'in HSK tedavisinde terapötik olarak değere sahip olabileceği ve bir tümör süpresör olarak değerlendirilebileceğini ifade etmişlerdir (189).

Yine 2012 yılında Hong-Yan ve ark. 32 adet HSK hastası ve 32 adet sağlıklı karaciğer dokusunda miR-125b ekspresyon seviyesini araştırmışlardır. Çalışmada miR-125b'nin kanserli dokulardaki ekspresyon seviyesinin kontrol dokularındaki seviyesinden çok daha az olduğunu saptamışlardır. Ayrıca HepG2, Huh gibi HSK hücre hatlarında da bu çalışmayı yaptıklarında yine miR-125b'nin sağlıklı hücre hatlarına göre ekspresyon seviyesinin daha az olduğunu saptamışlardır. Çalışmada miR-125b'nin Mcl-1 ve IL6R'in güçlü bir düzenleyicisi olduğu ve HSK'nın terapötik tedavisinde kullanılabileceği fikri öne sürülmüştür. Çalışmanın sonucunda miR-125b'nin HSK'da tümör süpresör olarak rol oynadığı gösterilmiştir (191).

2010 yılında Liang ve ark. 54 HSK'lı doku ve sağlıklı karaciğer dokularında yaptıkları çalışmada miR-125b'nin, HSK'lı dokularda kontrol dokularına oranla ekspresyon seviyesinin düştüğünü saptamışlardır. HSK'da hücre büyümesini hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda baskıladığını göstermişlerdir. Araştırmacılara göre miR-125b HSK'da potansiyel bir metastaz süpresörüdür. Ayrıca miR-125b'nin p21Cip1/Waf1'nin

ekspresyonu ile arttığı ve hücre döngüsünü G1'den S fazına geçişte tuttuğu gösterilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre miR-125b'nin HSK'da bir onkogen olan LIN28B'nin baskılanmasını sağlayan bir tümör supresör olarak rol oynadığı düşüncesi desteklenmiştir. Bu durum miR-125b'nin HSK tedavisinde de terapötik olarak kullanılabilirliği fikrini desteklemektedir (192).

MiR-125b ve HSK ile ilgili yapılan çalışmaların (189, 191, 192,193) bazılarından elde edilen bulgular ile bizim verilerimiz birbirinin tersi yöndedir. Bu sonucun, öncelikle çalışmalarda kullanılan örneklerin doku, hücre hattı ve serum gibi farklı olmalarından kaynaklanabileceği gibi çalışılan örnek sayılarının farklılıklarından da kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir

Hayes ve ark. 2012 yılında 248 HBV hasta serumunda 19 adet miRNA'nın ekspresyon seviyesini araştırmışlar, sağlıklı kontrol grubuna göre HBV serumlarında miR-125b seviyesinin oldukça yüksek çıktığını bulmuşlardır (193). Bu çalışma bizim çalışmamızla aynı veriye ulaşmıştır. Bu durum iki çalışmada da örnek seçiminde serum tercih edilmesinden kaynaklanıyor olabilir.

Murakami ve ark. (42) 2006 yılında 25 HSK'lı ve 25 normal karaciğer dokusunda yaptıkları çalışmada miR-125b ile aynı aileden olan miR-125a'nın (18) ekspresyon seviyesinin HSK'lı hastalarda azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışma ile bizim verilerimiz birbirinin aksi yönündedir. Bu farklılık yapılan çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak miR-125a'nın (miR-125b ile miR-125a, miR-125 ailesindedir ve sekans farklılığı taşımaktadır) ekspresyon seviyesinin değerlendirilmesinden ve yine birbirinden farklı olarak doku ve serum kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda serumlardaki ekspresyon seviyeleri ölçülen miRNA'lardan miR-223-3p gruplar açısından değerlendirildiğinde; kontrol grubu ile KHB hastalarını kıyasladığımızda KHB'li hasta serumundaki ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre 5.55 kat azaldığı, kontrol ile KCS hastaları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre KCS'lilerde 13.88 kat azaldığı, kontrol ile HSK hastaları karşılaştırıldığında ise yine kontrol grubuna göre HSK'lılarda 12.65 kat azaldığı saptandı. Bu azalma seviyeleri istatistiksel olarak da ($p < 0.01513$, $p < 0.0009440$, $p < 0.0001446$) anlamlı bulundu (Çizelge

4.2, 4.4, 4.6). Fakat KHB'li hastaların serumları ile KCS'li ve HSK'lı hasta serumları karşılaştırıldığında miR-223-3p ekspresyon seviyesinin, KHB'li serumdaki seviyesine oranla KCS'li hastalarda 2.5 kat ve HSK'lı hastalarda ise 2.278 kat azaldığı saptansa da (Çizelge 4.3, 4.5) veriler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0.1516$, $p < 0.1655$). KCS'li hasta serumları ile HSK'lı hasta serumlarındaki ekspresyon seviyesi farkına bakıldığında HSK'lı hastalarda 0.034 kat azalmanın gerçekleştiği saptanmıştır (Çizelge 4.7). Fakat bu grubun verileri de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p < 0.5$).

2011 yılında Jian ve ark. 101 HSK, 48 KHB ve 89 sağlıklı birey serumunda gerçekleştirdikleri çalışmada miR-223 ekspresyon seviyesinin KHB'li ve HSK'lı hastalarda, kontrol serumlarındaki seviyesine göre oldukça yüksek olduğunu saptadılar. Çalışmanın sonucunda, son zamanlarda yapılan farklı çalışmalarda miR-223'ün diğer kanser tiplerinde de serumda yüksek seviyede bulunduğunu belirtilerek HSK ya da KHB için spesifik bir markırdan ziyade karaciğer hasarını belirlemek amacıyla kullanılabilir bir markır olduğunu düşündüklerini ifade etmişlerdir (194). Bu çalışmada elde edilen bulgular ile bizim verilerimiz birbirinin tersi yöndedir. İki çalışmada da örnek olarak serumdan çalışılmasına rağmen sonuçta farklı verilere ulaşılması, çalışmalarda kullanılan örnek sayısının farklılığından da kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca dokularda hücresel düzeyde meydana gelen, henüz nedenini bilmediğimiz mekanizmalardan dolayı farklılıklar meydana gelmiş olabilir. Çeşitli miRNA'ların farklı kanser türleriyle ilişkisi araştırılmaktadır. miR-223 ailesi hepatositlere özgü değildir, ayrıca ekspresyon seviyesindeki değişim kansere bağlı olmayarak yalnızca karaciğerdeki hasara bağlı olarak da değişiklik gösteriyor olabilir. Bu sebeple bu miRNA'nın HSK ile ilişkilendirilmesi için daha çok çalışma verisiyle desteklenmesi gerektiği görüşündeyiz.

Zhao ve ark. 2011 yılında sağlıklı karaciğer dokuları, HSK'lı dokular ve hücre hatları üzerinde yaptıkları çalışmada, HSK'da, miR-223'ün c-myc üzerindeki düzenleyici rolünü araştırmışlardır. HSK hastalarında karaciğer dokusundaki miR-223 ekspresyon seviyesinin, sağlıklı bireylerdeki karaciğer dokusundaki ekspresyon seviyesine oranla düştüğü tespit edilmiştir. Ayrıca kanserli HepG2 hücreleri ile infetal karaciğer hücresi olan L02 karşılaştırıldığında, miR-223 seviyesinin HepG2'de azalan bir ekspresyona sahip

olduğu saptanmıştır. Fakat paraneoplastik ve HSK'lı hastalardaki ile normal karaciğer dokusundaki c-myc mRNA ve protein seviyeleri karşılaştırıldığında paraneoplastik ve HSK'lı hasta dokularındaki ekspresyon seviyesinin arttığı görülmüştür. Araştırmacılara göre bu durum, miR-223 ve c-myc'in negatif olarak korele olduğunu göstermektedir. Bu alışma verilerine göre, kanserli doku hücrelerinde miR-223'n ekspresyon seviyesinin yüksek olması durumunda c-myc gen ekspresyonunun ve biyolojik aktivitesinin azalmakta olduğunu düşünmektedirler. Araştırmacılara göre bu durum, miR-223 karsinogenez mekanizmasında c-myc yolağını kullanmakta olduğunu düşündürmekte ve HSK'da azalan miR-223'n ekspresyonu c-myc ekspresyon inhibisyonunun azalmasına yol açmaktadır. Çalışma verilerine göre normal seviyeler dışındaki yüksek ekspresyon seviyesine sahip olan c-myc hepatokarsinogenezde rol oynayabilir. Bu çalışmanın sonucu olarak miR-223'n ekspresyon seviyesinin azalmasının HSK'yı saptamada ve tedavide potansiyel olarak bir değere sahip olduğu belirtilmiştir (195).

Karakatsanis ve ark.'nın 2011 yılında 81 HSK'lı 98 sağlıklı bireylerin karaciğer dokularında yaptıkları çalışmada kontrol dokularına oranla HSK'lı dokularda miR-223'n ekspresyon seviyesinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak terapötik açıdan miRNA'ların kullanılabilmesi için oldukça fazla çalışmaya gerek olduğundan bahsetmişlerdir (196).

Queenie ve ark. 2008 yılında HCC'li karaciğer dokusu ve hücre hattındazerinde, toplamda 60rnekzerinde yaptıkları çalışmada, normal karaciğer dokularıyla karşılaştırdıklarında miR-223'in ekspresyon seviyesindeki değişiklik, KHB ardından gelişmiş HSK hastalarında sağlıklı dokulara göre ekspresyonunun azaldığı şeklinde gösterilmiştir. Ayrıca hepatit B veya hepatit C geçmişi olmadan HSK hastası olanlarla HSK'lı olmayan dokular karşılaştırıldığında yine miR-223'n HSK'lı dokularda ekspresyon oranının azaldığı görülmüştür. Çalışmada miR-223'n ekspresyonunun düzenlenmesinin HSK hücre hatlarının hücre canlılığızerine tutarlı bir inhibitör etki yaptığı gözlenmiştir. Çalışmada STMN1'in miR-223 için HSK'da olası bir hedef olduğunun düşünüldüğü belirtilmektedir. Çalışmanın sonucunda terapötik açıdan, miR-

223'ün, PTEN/PI3K yolu adına iyi bir belirteç olacağından STMN1'i düzenlediği için potansiyel olarak kanser tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir (197).

Bu çalışmalarda (195, 196, 197) elde edilen bulguların, kullanılan örnekler birbirinden serum ve doku şeklinde farklı olmasına rağmen bizim verilerimizle tutarlıdır.

Çalışmamızda serumlardaki ekspresyon seviyeleri ölçülen miRNA'lardan miR-122-5p'yi gruplar açısından değerlendirecek olursak; kontrol ile KHB hastalarını kıyasladığımızda KHB'li hasta serumundaki ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre 13.771 kat arttığı saptandı. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Çizelge 4.4.) ($p < 0.08824$). Kontrol ile KCS hastaları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre KCS'lilerde 13.377 kat arttığı, kontrol ile HSK hastaları karşılaştırıldığında ise yine kontrol grubuna göre HSK'lılarda 9.99 kat arttığı saptandı. Bu artış seviyeleri ise istatistiksel olarak ($p < 0.02778$, $p < 0.02778$) anlamlı bulundu (Çizelge 4.2, 4.6). Fakat KHB'li hastaların serumları ile KCS'li ve HSK'lı hasta serumları karşılaştırıldığında miR-122-5p ekspresyon seviyesinin, KHB'li serumdaki seviyesine oranla KCS'li hastalarda 0.971 kat arttığı ve HSK'lı hastalarda ise 1.378 kat azaldığı saptanmıştır. KCS'li hasta serumları ile HSK'lı hasta serumlarındaki ekspresyon seviyesi farkına bakıldığında ise 0.748 kat azalmanın HSK'lı hastalarda gerçekleştiği bulunmuştur (Çizelge 4.3, 4.5, 4.7). Fakat bu grupların verileri de istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0.1516$, $p < 0.1655$, $p < 0.5$).

Queenie ve ark. 2008 yılında karaciğer dokuları ve hücre hatları üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Normal dokularla karşılaştırma yaptıklarında HSK'lı dokularda miR-122'nin ekspresyon seviyesindeki azalma gösterilmiştir (197).

2009 yılında Coulouarn ve ark. 64 HSK'lı ve 28 sağlıklı karaciğer dokusunda yaptıkları çalışmada karaciğerdeki toplam miRNA popülasyonunun %70'ni oluşturan miR-122'nin HSK'da ekspresyon seviyesinin düştüğünü, özellikle kötü prognoza sahip primer tümörlerin ilk safhalarında ekspresyonun bastırıldığını rapor etmişlerdir. Ayrıca hepatik fenotipin bastırılması ve tümörün invaziv özelliğinin artması gibi belirli gen ekspresyonlarına bağlı olarak gelişen tümör hücreleri incelendiğinde gözlenen miR-122'nin ekspresyon seviyesindeki düşüş özellikle kanser ile ilişkili olduğunu saptamışlardır.

Çalışmanın sonucunda miR-122'nin hepatositlere özgü olduğu ve hücre göçü ile hücrelerin invaziv haline gelmesini kontrol eden önemli bir markır olabileceğini belirtmişlerdir (198).

Fornari ve ark. 2009 yılında, 57 HSK ve KCS'li hasta dokusunda yaptıkları çalışmada miR-122'deki ekspresyon seviyesinin azalmasının HSK'ya yol açtığını göstermeyi amaçlamışlardır. miR-122 seviyesinin sağlıklı dokulara oranla kanserli ve HSK'lı hastalarda ekspresyon seviyesinin düştüğünü, dolayısıyla HSK'da miRNA tabanlı biyolojik tedavide kullanılabileceği gösterilmiştir (199).

Bahsedilen çalışmalarda (197, 198, 199) elde edilen bulgular ile bizim verilerimiz birbirinin tersi yöndedir. Bu sonucun, çalışmalarda kullanılan değişik örneklerden kaynaklanabileceği gibi çalışmaya dahil edilen örnek sayısının farklılığından da kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Jian ve ark. 2011 yılında serum örneklerinde gerçekleştirdikleri çalışmada miR-122 seviyesinin KHB'li ve HSK'lı hastalarda, kontrol serumlarındaki seviyelerine göre oldukça yüksek olduğunu saptamışlardır. Buna ek olarak KHB'li hastaların serumlarında miR-122 seviyesinin HSK hastalarının serumlarına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucuna göre, primer HSK hastaları ile donör serumları karşılaştırıldığında ekspresyon seviyesi normalin dışına çıkan miR-122'nin, HSK hastalarında yüksek seviyede gözlenmiş olması özellikle karaciğere özgü olduğu bilinen bu miRNA'nın bir markır olarak kullanılabileceği yönündedir. Ayrıca miR-122'nin KHB hastalarının serumunda da yüksek seviyede bulunmuş olması karaciğerde inflamasyondan dolayı meydana gelen hasara işaret ettiği düşünülmektedir. Çalışmaya göre bu miRNA HSK tedavisinde markır olma adayı olarak düşünülebilir (194).

Karakatsanis ve ark. 2011 yılında HSK'lı hasta dokularında yaptıkları çalışmada normal dokulara göre, miR-122'nin ekspresyon seviyesinin arttığını saptamışlardır. Çalışmanın sonucunda miR-122'nin ekspresyonunun KCS ve HSK'da korele olarak arttığını, sonuç olarak terapötik açıdan miRNA'ların kullanılabilmesi için oldukça fazla çalışmaya gerek olduğundan bahsetmişlerdir (196).

Hayes ve ark. 2012 yılında 248 HBV'li hasta serumunda gerçekleştirdikleri çalışmada sağlıklı kontrol grubuna göre HBV serumlarında miR-122'nin seviyesinin oldukça yüksek çıktığını bulmuşlardır. KHB'li hastalarda HBsAg seviyesi yüksek olanlarla miR-122'nin seviyesinin de yüksek olduğu bulunmuştur (193).

Novellino ve ark. 2012 yılında 11 HBsAg pozitif ve 2 sağlıklı birey serumunda yaptıkları çalışmada karaciğerdeki, fibrosis veya rejenerasyonda miR-122'nin serumda HBsAg ile ilişkisini araştırmışlardır. HBsAg taşıyıcısı olanlarda miR-122 ekspresyon seviyesini bir hayli yüksek bulmuşlardır (200).

Bahsedilen çalışmalarda (193, 194, 196, 197, 200) elde edilen bulgular ile bizim verilerimiz birbiriyle aynı doğrultudadır. Çalışmaların bazılarında kullanılan örnek bizim örneklerimizle aynı olmasına rağmen bazıları örnek olarak dokuyu tercih etmiştir ve bu duruma rağmen sonuç verilerimiz birbiriyle paraleldir.

Çalışmamızda serumlardaki ekspresyon seviyeleri ölçülen miRNA'lardan miR-92a-3p'yi gruplar açısından değerlendirecek olursak; kontrol ile KHB hastalarını kıyasladığımızda KHB'li hasta serumundaki ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre 1.107 kat arttığı saptandı. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p < 0.3529$). Kontrol ile KCS hastaları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre KCS'lilerde 1.274 kat arttığı saptandı fakat bu artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p < 0.3001$). Kontrol grubu ile HSK hastaları karşılaştırıldığında ise yine kontrol grubuna göre HSK'lılarda 2.44 kat arttığı saptandı. Bu artış seviyesi ise istatistiksel olarak ($p < 0.02434$) anlamlı bulundu (Çizelge:4.2, 4.4, 4.6). Fakat KHB'li hastaların serumları ile KCS'li ve HSK'lı hasta serumları karşılaştırıldığında miR-92a-5p ekspresyon seviyesinin, KHB'li serumdaki seviyesine oranla KCS'li hastalarda 1.150 kat arttığı, bu değer ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirendi ($p < 0.4689$). KHB'li grup ile HSK'lı hastalardaki ekspresyon farklılığı ise HSK'lılarda 2.209 kat arttığı şeklinde bulundu ve bu veri istatistiksel olarak da anlamlı bir veri şeklinde yorumlandı ($p < 0.02314$). KCS'li hasta serumları ile HSK'lı hasta serumlarındaki ekspresyon seviyesi farkına bakıldığında ise 1.92 kat artışın HSK'lı hastalarda gerçekleştiği bulundu. Fakat bu grubun verileri de istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0.5$). Çalışmamızda miR-92a-5p sadece iki grup karşılaştırmasında istatistiksel

olarak anlamlı bulunsa da, istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan gruplarla da diğerleri arasında bir paralellik bulunarak tüm gruplarda ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna göre bir artış saptanmıştır. Bu sebeple tartışma kısmında miR-92a-5p'ye yer verdik.

Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda; Shigoka ve ark. 2010 yılında yaptığı çalışmada miR-92a'nın HSK'lı hasta dokularından elde edilen hücre hatlarında sağlıklı bireylerden elde edilenlere oranla ekspresyon seviyesinin arttığını fakat HSK'lı hastaların plazmalarında kontrol plazmalarına oranla düştüğü ifade edilmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar, plazma ve hücredeki miR-92a ekspresyon seviyesinin artış ve azalış etkilerinin henüz bilinmediğini fakat HSK gelişimi ile ilişkili olabileceğini savunmuşlardır (201).

Hayes ve ark. 2010 yılında HBV'li hasta serumlarında yaptıkları çalışmada kontrol serumlarına göre HBV'lilerde miR-92a ekspresyon seviyesinde azalma saptamışlardır (193).

Bu çalışmaların verileri ile bizim verilerimiz birbirinin aksi yöndedir. Bu durum çalışılan materyal farklılığından kaynaklanıyor veya çalışılan örnek sayısından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada, sağlıklı kontrol kan serumları ile KHB, KCS ve HSK hastalarının kan serumlarını, ikili gruplar şeklinde düşünülerek (Çizelge 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7.) çeşitli miRNA'ların ekspresyon seviyelerini tespit amacıyla karşılaştırdık. Fakat temel olarak kontrol grubu ile KHB, KCS ve HSK'nın karşılaştırılmasını baz aldık. Karşılaştırmanın sonucunda miR-125b-5p'nin, istikrarlı bir şekilde KHB'den HSK'ya giden yolda ekspresyon seviyesinin arttığını saptadık. miR-223-3p'de ise durum yine KHB'den HSK'ya doğru gelişen süreçte ekspresyonda azalma olarak saptandı. İkili gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık ifade eden fakat duruma tüme varım şeklinde bakıldığında KHB'den KCS'ye ve oradan da HSK'ya geçişte paralellik izleyen bulgular saptanmadı. Bir tek miR-122 genel olarak karaciğere özgü olduğundan dolayı, her ne kadar bizim çalışmamızda kontrol grubu ile KHB karşılaştırılmasında istatistiksel olarak değerli olmasa da, tartışmada yer verildi. Yine miR-92a-3p bir çok grubun karşılaştırılmasında ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı verilere sahip olmasa da, bütün gruplar arasında paralel bir durumla artış saptandığı için tartışmada yer verilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda, deneyler doku üzerinde yürütüldüğünden miRNA ekspresyon seviyesi az bulunurken serumdan çalışıldığında ise seviye yüksek bulunmuştur. Dünya üzerinde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırdığımızda genel olarak HSK'da miR-122 ve miR-125b-5p seviyelerinin azaldığından bahsedilirken biz çalışmamızda tam tersini bulduk. miR-223-3p ise diğer literatüre uygunluk göstererek bizim çalışmamızda da ekspresyon seviyesi düşük çıkmıştır.

Bu durum daha öncede bahsettiğimiz gibi dokudan, plazmadan veya serumdan çalışmaktan dolayı meydana gelen bir farklılık olabilir. Fakat biz de diğer çalışmalara paralel olan sonuçlarımıza dayanarak miR-223-3p ve miR-125b-5p'nin HSK'nın tanısında bir erken tanı markır olarak kullanılabileceği sonucuna vardık.

Çalışmamız ile elde ettiğimiz bulgular, bu alanda yapılmış olan az sayıdaki çalışmaya önemli katkılar sağlar nitelikte olup bildiğimiz kadarıyla ülkemizde bu konuda

yapılan ilk çalışmadır. Çalışmanın daha geniş hasta serilerinde çalışılması ile miR-223-3p ve miR-125b-5p'nin tanısal prediktif değerinin daha da desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR:

1. **Le Quesne J, Caldas C.** Micro-RNAs and breast cancer. *Mol Oncol*, **2010**;4:230-241
2. **Esquela-Kerscher A, Slack FJ.** Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, **2006**;6:259-269.
3. **Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.** The *C. elegans* hetero-chronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. **1993**;75: 843–854.
4. **Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI.** MicroRNAs and cancer. *Br J Surg*, **2007**;94:23–30.
5. **Shenouda SK, Alahari SK.** MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*. **2009**;28:369–378.
6. **Calin G A.** Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *PNAS*. **2004**;101:2999–3004.
7. **Erensoy S.** İnsan Kanseri Virüsleri. In: Brooks F G, *Butel S J. Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology* 24rd Ed. **2010**:585-560.
8. **Fallot G, Neuveut C.** Diverse roles of hepatitis B virus in liver cancer. *Curr Opin Virol*. **2012**; 2(4):467-473.
9. **<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>.WHO(WorldHealthOrganization) Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet July 2012; Erişim: 20.10.2012.**
10. **Jensen DM, Te SH.** Epidemiology of Hepatitis B and C Virüsleri: A Global Overview. *Clin Liver Dis*, **2010**;14:1-21.
11. **EASL.** International Consensus Conference on Hepatitis B. Consensus statement (Short version). *J Hepatol*, **2003**;38(4):533-540.
12. **Berman C.** Primary carcinoma of the liver. *Bull. N. Y. Acad. Med.***1959**; 35(5):276-292.

13. **Chu CM, Liaw YF.** Hepatitis B virus infection. *Lancet*, **2009**;373:582-592
14. **Shi CH, Shi YH.** Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, **2009**;15(25):3099-3105.
15. **Werb Z, Coussens LM.** Inflammation and cancer. *Nature*, **2002**;420(6917):860-870.
16. **Murakami Y, Yasuda T.** Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*. **2006**; 25: 2537–2545.
17. **Gümüş TL, Serin SM.** Kanserin Erken Tanısında Moleküler Altyapı Laboratuvarının Oluşturulması Projesi **2012**; 39-41.
18. **http://www.mirbase.org/cgi-bin/miRNA_summary.** Erişim:09/09/2012.
19. **Bentwich I, Avniel A.** Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*, **2005**; 37:766-770.
20. **Lim LP, Lau NC.** The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, **2003**;17:991-1008.
21. **Hammond SM.** MicroRNA therapeutics: a new niche for antisense nucleic acids. *Trends Mol Med*. **2006**;12(3):99-101.
22. **Ruvkun G.** Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, **2001**; 294: 797–799.
23. **Pasquinelli EA, Reinhart JB.** Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, **2000**;408:86-89.
24. **Ketting RF.** Dicer function in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C.elegans*. *Genes Dev*. **2001**;15;:2654-2659.
25. **Reinhart BJ, Slack FJ.** The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **2000**;403:901–906.
26. **Kwak PB, Iwasaki S.** The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*, **2010**;101:2309-2315.

27. **Rodriguez A, Griffiths-Jones S.** Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, **2004**;14:1902-1910.
28. **Bartel DP.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. An excellent review of plant and animal miRNAs that discusses how miRNAs differ from siRNAs. *Cell*, **2004**;116:281–297.
29. **Cai X, Hagedorn CH.** Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, **2004**; 10, 1957–1966.
30. **Bentwich, I.** Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature Genet*, **2005**; 37:766–770.
31. **Lee Y, Ahn C.** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **2003**;425:415-419.
32. **Denli AM, Tops BB.** Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, **2004**;432(7014):231-235.
33. **Gregory RI, Yan KP, Amuthan G.** The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. **2004**; 432(7014):235-240.
34. **Joshua E, Blelloch R .** Small RNAs – their biogenesis, regulation and function in embryonic stem cells. **In: Kit T Rodolfa** *StemBook [Internet]*.Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute **2008**:1-14.
35. **Elsebet L, Stephan G.** Nuclear export of microrna precursors. *Science*.**2004**; 303:95-98.
36. **Kwak PB, Iwasaki S.** The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci.* **2010**; 101(11):2309-2315.
37. **Zhang H, Kolb FA.** Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J.***2002**; 21:5875-5885.
38. **Bernstein E, Caudy AA.** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. **2001**;409:363-366.
39. **Kong, YW, Cannell IG.** The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined bythe promoter of the target gene.*PNAS*, **2008**:105(26); 8866-8871.

40. **Pillai RS, Bhattacharyya SN.** Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells. *Science*, **2005**;309:1573-1576.
41. **Gregory RI, Chendrimada TP.** Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, **2005**;123: 631-640.
42. **Pillai RS.** MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA. *RNA*, **2005**;11:1753–1761.
43. **Petersen M, Nielsen CB.** The conformations of locked nucleic acids (LNA). *J Mol Recognit.* **2000**;13(1):44-53.
44. **Valoczi A, Hornyik C.** Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*, **2004**;32(22):1-7.
45. **Elton TC.** Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, **2008**;44:31–38.
46. **Calin GA, Dumitru CD.** Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS*. **2002**;99:15524-15529.
47. **Bartels LC, Tsongalis JG.** MicroRNAs: Novel Biomarkers for Human Cancer. *Clin Chem*, **2009**; 55(4):623-631.
48. **Wijnhoven BP, Michael MZ.** MicroRNAs and cancer. *Br J Surg*. **2007**; 94: 23–30.
49. **Michael MZ, O'Connor SM.** Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. **2003**;1: 882–891.
50. **Metzler M, Wilda M.** High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. **2004**; 39(2):167-169.
51. **Chan JA, Krichevsky AM.** MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* **2005**; 65:6029–6033.

52. **He H, Jazdzewski K.** The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *PNAS*. **2005**; 102: 19075–19080.
53. **Sevli S, Uzumcu A.** The function microRNAs, small potent molecules in human prostate cancer. *Prostate Cancer P D*. **2010**;13:208-217.
54. **Cimmino A, Calin GA.** miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *PNAS*. **2005**;102(39):13944–13949.
55. **Johnson SM, Grosshans H.** RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, **2005**;120: 635–647.
56. **Tam W, Ben-Yehuda D.** Novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Molecular and Cellular Biology*. **1997**; 17(3):1490-1502.
57. **Ciafre SA, Galardi S.** Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*. **2005**; 334:1351–1358.
58. **Garzon R, Volinia S.** MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. **2008**; 111:3183–3189.
59. **Calin GA, Ferracin M.** A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. **2005**; 353:1793–1801.
60. **Volinia S, Calin GA.** MicroRNA expression signature in human solid tumors defines cancer targets. *PNAS*, **2006**;103:2257–2261.
61. **Meng F, Henson RH.** MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. **2007**;133:647–658.
62. **Pelengaris S, Khan M.** Suppression of Myc-induced apoptosis in β cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell*. **2002**; 109: 321–334.
63. **He L, Thomson JM.** A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. **2005**; 435(7043):828–833.
64. **Jemal A, Siegel R.** Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. **2008**; 58:71–96.

65. **Bruix J, Sherman M.** American Association for the Study of Liver Diseases practice guideline. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. **2008**; 42:1208–1236.
66. **Ladeiro Y, Couchy G.** MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology*. **2008**; 47:1955–1963.
67. **Li W, Xie L.** Diagnostic and prognostic implications of micro-RNAs in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. **2008**; 123:1616–1622.
68. **Jiang J, Gusev Y.** Association of microRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Can Res*. **2008**; 14:419–427.
69. **Fornari F, Gramantieri L.** miR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. **2008**; 27:5651–5661.
70. **Barasch A, Peterson DE.** Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. *Oral Oncol*. **2003**; 39(2):91-100.
71. **Münker K.** Mechanisms of human papilloma virus-induced oncogenesis. *J Virol*. **2004**; 78(21): 11451-11460
72. **Khalili K, Raab-Traub N.** *Cancer viruses. Oncogene Rev*. **2003**; 22:609-639.
73. **Bosch FX.** The casual relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. **2002**; 55:244-265.
74. **Butel JS.** Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis*, **2000**; 21:405-426.
75. **Mahoney FJ.** Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev*, **1999**; 12:351-366.
76. **Mason WS, Seeger C.** Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, **2000**; 64:51-68.

77. **İnal AS, Dundar Hİ.** Viral Hepatit. 1.Baskı. İstanbul: Orhan Matbaası, **2005**;10-20.
78. **Robinson WS:** Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. Mandeli GL, Douglas RG, Bennett JE (Eds). Principles and Practice of Infectious Disease. 3rd ed. New York, Churchill Livingstone. **1990**: 1204-1231.
79. **Tabak F.** Virus Hepatitlerinin Epidemiyolojisi. In: Yucel A, Tabak F. Günümüzde virus hepatitleri. 2 Baskı. İstanbul: İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği. **1998**; 21-30.
80. **Purcell RH.** The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology*. **1993**;104: 955-963.
81. **Krugman S, Giles JP,** Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA*. **1967**; 200(5):365-373.
82. **Robinson WS.** Hepadnaviridae and their replication. Fields BN, Knipe DM (Eds). Fundamental Virology. 2nd ed. New York Raven Press Ltd. **1991**:989-1021.
83. **Tennant BC, Mrosovsky N.** Hepatocellular carcinoma in Richardson's ground squirrels: evidence for association with hepatitis B virus infection. *Hepatology*. **1991**;13:1215-1221.
84. **Testut P, Renard CA.** A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* **1996**;70:4210-4219.
85. **Thorgeirsson SS.** Hepatic stem cells in the liver regenerations. *FA-SEB J*. **1996**;10:1249-1256.
86. **Thorgeirsson SS, Evaets HC.** Hepatic stem cell compartment: activation and lineage commitment. *Proc Soc Exp Biol Med*. **1993**;204:253-260.
87. **Nowak MA, Bonhoeffer S.** Viral dynamics in hepatitis B virus infection, *PNAS*. **1996**; 93:4398-4402.
88. **Yenen OS.** Viral Hepatitler. In: Topçu AV, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları. 1. Baskı. İstanbul: Nobel Kitapevleri Ltd. Şti, **1996**; 641-700.
89. **Kramvis A, Arakawa K.** Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol*. **2008**; 80(1):27-46.

90. **Banerjee A, Banerjee S.** Nucleic acid sequence analysis of basal core promoter/precore/core region of hepatitis B virus isolated from chronic carriers of the virus from Kolkata, eastern India: low frequency of mutation in the precore region. *Intervirology*. **2005**; 48(6):389-399.
91. **Kreutz C.** Molecular, immunological and clinical properties of mutated hepatitis B viruses. *J Cell Mol Med*. **2002**;6(1):113-143.
92. World Health Organization. Hepatitis B virus. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. WHO, **1994**;59: 45-163.
93. **Özacar T, Bilgiç A.** Hepatit B ve D virusları. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1Baskı. Ankara: GüneşKitapevi, 1999; 1056-1070.
94. **Schildgen V, Lüsebrink J.** HBV: Virology. In: Mauss SA, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. Hepatology: A Clinical Textbook. 1st Ed. Germany: Flying Publisher, **2009**; 55-74.
95. **Thomas HC, Karayiannis P.** Hepatitis B Virus: General Features. In: Mary BWJ, Regenmortel MHV. Encyclopedia of Virology. 3rd Ed. Strasbourg, France: Elsevier B.V, **2008**; 350-360.
96. **Laoi BN, Crowley B.** Molecular characterization of hepatitis B virus (HBV) isolates, including identification of a novel recombinant, in patients with acute HBV infection attending an Irish hospital. *J Med Virol*. **2008**; 80(9):1554-1564.
97. **Badur S.** Viral Hepatitler. In:Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 1. Baskı. Ankara: Güneş Kitapevi, **2004**; 175-202.
98. **Ganem D.** Hepadnaviridae and their replication. Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds). Fields Virology 3rd ed. Lippincott, Raven Press. **1996**, 2703-2737.
99. **Thiollais P, Pourcel C.** The hepatitis B virus. *Nature*. **1985**; 317: 489-495.
100. **Chang M.** Hepatitis B virus mutation in children. *Indian J Pediatr*, **2006**; 73:803-807.
101. **Wright TL, Terrault NA.** Viral hepatitis A through G. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management. 6th Ed. New York: W.B Saunders Company, **1998**; 1123-1155.

102. **Echevarría JM, Avellón A.** Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol.* **2006**; 78:36-42
103. **Denis F, Ranger-Rogez S.** Screening of pregnant women for hepatitis B markers in a French Provincial University Hospital (Limoges) during 15 years. *Eur J Epidemiol* **2004**; 19(10):973-978.
104. **Alexopoulou A.** Mutants in precore, core promoter and core regions of Hepatitis B virus and their clinical relevance. *Annals of Gastroenterology.* **2009**; 22(60):13-23.
105. **Buckwold VE, Xu Z.** Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol.* **1996**; 70(9):5845-5851.
106. **Gill FM, Hunt CM.** Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology.* **2000**; 31:1037-1044.
107. World Health Organization. Hepatitis B. Erişim: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en>
108. **Serter D.** Hepatit virüsleri ve viral hepatitler. Serter D (Editör). Virüs riketsiya ve klamidya hastalıkları'nda. 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; **1997**:175-206.
109. **Dienstag JL, Isselbacher KJ.** Acute hepatitis. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL (Eds.). Harrison's principles of internal medicine. 13thed. New York: McGraw-Hill; **1994**: 1458-1478.
110. **Alkan G N, Balcı İ.** Hepatit ön tanılı hastalarda hepatit belirleyicilerinin incelenmesi. *Viral Hepatit Dergisi.* **1998**; (1):56-58.
111. **Gerlich WH, Kann M.** Structure and Molecular Virology. In: Thomas H, Lemon S, Zuckerman A. Viral Hepatitis. 3rd Ed. Churchill Livingstone: Blackwell Publishing, **2005**; 149-179.
112. **Nassal M, Beck D.** Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol.* **2007**; 13(60):48-64.
113. **Gong ZJ, Meyer SD.** Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat.* **2003**; 4(3):145-153
114. **Neurath AR, Kent SBH.** Antibodies to a synthetic peptid from the pre-S(2) 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine.* **1986**; 4(1): 35-37

115. **Thomas HC, Carman WF.** Envelope and precore/core variants of hepatitis B virus. Martin PM, Friedman LS(Eds). *Viral Hepatitis. Gastroenterol. Clin. N Amer.* **1994**; 23: 499-514.
116. **Lau JYN, Wright TL.** Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet.* **1993**; 342: 1335-1340.
117. **Foster GR, Thomas HC.** Mutation of gene for mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet.* **1996**; 348(9039):1396-1397.
118. **Strauss JH, Strauss EG.** Viruses and Human Disease, 2ed. Ed.,Oxford,UK: Elsevier Academic Press,2008:249.
119. **Glebe D.** Recent advances in hepatitis B virus research: A German point of view. *World J Gastroenterol*, **2007**; 13(60):8-13.
120. **Yoon GS, Jeong JK.** Evidence that 5' -end cap structure is essential for encapsilation of hepatitis B virus pregenomic RNA. *J Virol.* **2000**; 74(12):5502-5508.
121. **Akan E.** Viral hepatitler. Genel ve Özel Viroloji. 3. Baskı, İzmir, Saray Kitapevleri **1994**: 502-549.
122. **Kramvis A, Kew M.** Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine.* **2005**; 23:2409-2423
123. **Okamoto H, Tsuda F.** Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* **1988**; 69(10):2575-2583.
124. **Norder H, Hammas B.** Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of thecorresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol.* **1992**; 73(5):1201-1208.
125. **Stuyver L, De Gendt S.** A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol.* **2000**; 81(1):67-74.
126. **Arauz-Ruiz P, Norder H.** A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol.* **2002**; 83(8):2059-2073.

127. **Zeng GB, Wen SJ.** A novel hepatitis B virus genotyping system by using restriction fragment length polymorphism patterns of S gene amplicons. *World J Gastroenterol.* **2004**; 10(21):3132-3136.
128. **Stephan S.** Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol,* **2007**; 13(60):14-21.
129. **Zoulim F, Kay A.** Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* **2007**; 127(2):164-176.
130. **Kramvis A, Arakawa K.** Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol.* **2008**; 80(1):27-46.
131. **Ustaçelebi Ş, Ergünay K.** Hepatit B virusunun moleküler virolojisi. Ed: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. *Viral Hepatit 2007.* 1. baskı. İstanbul: Ohan Matbaası, **2007**:96-100
132. **Serin MS, Akkiz H.** Genotyping of hepatitis B virus isolated from chronic hepatitis B patients in the south of Turkey by DNA cycle-sequencing method. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2005**; 53(1):57-60.
133. **Ozdemir FT, Duman D.** Determination of hepatitis B genotypes in patients with chronic hepatitis B virus infection in Turkey. *Turk J Gastroenterol.* **2005**; 16(4):183-187.
134. **Yalcin K, Degertekin H.** Hepatitis B virus genotype D prevails in patients with persistently elevated or normal ALT levels in Turkey. *Infection.* **2004**; 32(1):24-29.
135. **Sunbul M, Leblebicioglu H.** Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol.* **2005**; 11(13):1976-1980.
136. **Sertozy RY, Erensoy S.** Restriction fragment length polymorphism analysis and direct sequencing for determination of HBV genotypes in a Turkish population. *New Microbiol.* **2008**; 31(2):189-194.
137. **Aksoy A, Ozdarendeli A.** Genotyping of hepatitis B virus by restriction enzyme analysis. *Mikrobiyol Bul.* **2006**; 40(3):215-223.

138. **Leblebicioglu H, Eroglu C.** Members of the Hepatitis Study Group. Acute hepatitis B virus infection in Turkey: epidemiology and genotype distribution. *Clin Microbiol Infect.* **2004**; 10(6):537-541.
139. **Elkady A, Tanaka Y.** Virological and clinical implication of core promoter C1752/V1753 and T1764/G1766 mutations in hepatitis B virus genotype D infection in Mongolia. *J Gastroenterol Hepatol.* **2008**; 23(3):474-481.
140. **Thakur V, Guptan RC.** Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol.* **2002**; 17(2):165-170.
141. **Rosenberg W.** Mechanism of immune escape in viral hepatitis. *Gut.* **1999**; 44: 759-764.
142. **Kato J, Hasegawa K.** A molecular analysis of viral persistence in surface antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology.* **1996**; 23: 389-395.
143. **Protzer Knolle U, Naumann U.** Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immunoglobulin after liver transplantation. *Hepatology.* **1998**; 27: 254-263.
144. **Bachmann MF, McKall FK.** Distinct role for LFA-1 and CD28 during activation of native T cells, adhesion versus costimulation. *Immunity.* **1997**; 549-557.
145. **Kundig IM, Shahinian A.** Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity.* **1996**; 5: 41 -52.
146. **Carman WF, Boner W.** Hepatitis B core protein mutations are concentrated in B cell epitopes in progressive disease and in T helper cell epitopes during clinical remission. *J Infect Dis.* **1997**; 175(5):1093-1100.
147. **Bertoletti A, Sette A.** Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for cytotoxic T cells. *Nature.* **1994**; 369: 407-410.
148. **Thurs MR, Kwiatkowski D.** Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *Engl J Med.* **1995**; 332: 1065-1069.

149. **Thursz MR, Thomas HC.** Heterozigote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection. *Nat Genet* **1997**; 17: 11-12.
150. **Moss PA, Rosenberg WM.** The human T cell receptor in health and disease. *Ann Rev Immunol.* **1992**; 10:71-96.
151. **Rodriguez UA, Brunetto MR.** Hepatitis B virus mutants. *Intervirology*, **1999**; 42(2):69-80.
152. **Okosuka O, Arai M.** Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. *Med Mol Morphol.* **2006**; 39(3):113-120.
153. **Wu GY, Coash M.** Molecular virology of Hepatitis B and C: Clinical implications. In: Shetty K, Wu GY. *Clinical Gastroenterology: Chronic Viral Hepatitis.* 2nd Ed. New Jersey: Human Press, **2009**; 1-31.
154. **Elkady A, Tanaka Y.** Virological and clinical implication of core promoter C1752/V1753 and T1764/G1766 mutations in hepatitis B virus genotype D infection in Mongolia. *J Gastroenterol Hepatol.* **2008**; 23(3):474-481
155. **Herron JC, Freeman S.** Evrimsel düşünce için bir örnek: HIV'i anlamak. In: KaraytuğS, Çıplak B, Başbüyük HH, Gündüz i. *Evrimsel Analiz.* 1. Baskı. Ankara: Palme yayınevi, **2007**; 3-19.
156. **McMillan J, Locarnini S.** The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis*, **2003**; 23:5-20.
157. **Thimme R, Baumert TF.** Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, **2007**; 13(60):82-90.
158. **Mantegani A, Mayerat C.** Does hepatitis B virus genotype influence the clinical outcome of HBV infection. *J Viral Hepat*, **1999**; 6(4):299-304.
159. **Saitoh T, Uchida T.** Mutations of the X region of hepatitis B virus and clinical implications. *Pathol Int*, **1997**; 47:183-193.
160. **Kidd-Ljunggren K, Oberg M.** The hepatitis B virus X gene: analysis of functional domain variation and gene phylogeny using multiple sequences. *J Gen Virol*, **1995**; 76: 2119-2130.

161. **Lin J, Liu XH.** COOH-terminal deletion of HBx gene is a frequent event in HBV-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* **2008**; 14(9):1346-1352.
162. **Robinson WS.** Hepadnaviridae: Hepatit B and D virüs. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller A, Tenover FC, Tenover FC. *Principles and Practice of Infectious Disease.* 5th Ed. New York: Churchill Livingstone, **2000**; 1652-1685.
163. **Chauhan R, Kazim SN.** Basal core promoter, precore region mutations of HBV and their association with e antigen, genotype, and severity of liver disease in patients with chronic hepatitis B in India. *J Med Virol.* **2006**; 78(8):1047-1054.
164. **Yokosuka O, Arai M.** Molecular biology of hepatitis B virüs: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. *Med Mol Morphol.* **2006**; 39(3):113-120.
165. **Kew M, François G.** Mutant hepatitis B virüs: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implication. *Vaccine,* **2001**; 19:3799-3815.
166. **Tasyaran M.** HBV infeksiyonunun epidemiyolojisi. In: Kılıçturgay K, Badur S. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 1.Baskı. istanbul,* **2001**; 85-120.
167. **http://www.saglik.gov.tr/istatistikler/temel2004/tablo-42.htm.** T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Çalışma Yıllığı, **2004.** Erişim:20.10.2012.
168. **http://www.saglik.gov.tr/istatistikler 2010** T.C. Sağlık Bakanlığı, Sağlık İstatistikleri Yıllığı. Erişim:20.10.2012.
169. **Ertuğrul Ö, Baykan M.** Türkiye'de HBV ve HCV infeksiyonlarının durumu. *Genel Tıp Derg,* **2001**; 11(2):89-92.
170. **Kew MC.** Epidemiology of chronic hepatitis B virüs infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virüs-induced hepatocellular carcinoma. *Pathologie Biologie,* **2010**; 58(4):273-277.
171. **Missale G, Boni C.** Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol,* **2003**; 39:36-42.
172. **Locarnini S, Lee JY.** Hepatitis B virüs: pathogenesis, viral intermediates and viral replication. *Clin Liver Dis,* **2004**; 8:301-320.

173. **Sonsuz A.** HBsAg (+) hastaya yaklaşım. 10. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi. Antalya, 15-19 Ekim **2008**; 142-146.
174. **Hoofnagle JH.** Hepatitis B In: Haubrich WS, Schaffner F, Berk JE. Bockus Gastroenterology. 5thEd. Philadelphia: W.B. Saunders Company, **1995**; 2062-2078.
175. **Değertekin B.** Hepatit B Patogenezi, Doğal Seyri ve Kliniği. *Journal of Gastroenterohepatology*, **2010**; 3(60):45-52.
176. **Leung N, Hui CK.** Natural history and disease progression in Chinese chronic hepatitis B patientsin immunetolerant phase. *Hepatology*, **2007**; 46(2):395-401.
177. **Fattovich G.** Natural history of hepatitis B. *J Hepatol*, **2003**; 39:50-58.
178. **Lai CL, Lau GKK.** The natural history of chronic hepatitis B infection. *Hong Kong Med J*, **1997**; 3:283-288.
179. **Berman C.** Primary carcinoma of the liver. *Bull. N. Y. Acad. Med.***1959**; 35(5):276-292.
180. **Hsu HC, Huang AM.** Genetic alterations at the splice junction of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **1994**; 19:122-128.
181. **Nguyen VT, Law MG.** Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: Epidemiological charecteristics and disease burden. *J. Viral Hepatit*, **2009**;16:453-463.
182. **Akarca US.** Chronic hepatitis B, a guideline to diagnosis, approach, management and follow up 2007.Turkish Association for the Study of Liver.Turk J Gastroenterol, **2008**; 19:207-230.
183. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Technical Report: Hepatitis B and C in the EU neighbourhood: prevalence, burden of disease and screening policies. Literature review; **ECDC** Stockholm, **2010**.
184. **Mıstık R.** Ülkemizde kronik viral hepatitlerin epidemiyolojisi. *Klimik Dergisi*, **2007**; 20:61-63.

185. **Tözün N, Özdoğan OC.** A nation wide prevalence study and risk factors for hepatitis A, B, C and D infections in Turkey. The 61st Annual meeting of the American Association for the study of liver diseases (AASLD). Boston, Oct29-Nov2 2010.
186. **Somali I, Alacacioğlu A.** Epidemiology and Survival of Hepatocellular Carcinoma in Turkey: Outcome of Multicenter Study. *Jpn J Clin Onco*, **2008**; 38(10):683-688.
187. **Su C, Hou Z.** Ectopic expression of microRNA-155 enhances innate antiviral immunity against HBV infection in human hepatoma cells. *Virology*. **2011**; 18(8):354.
188. **Ha TY.** MicroRNAs in Human Diseases: From Lung, Liver and Kidney Diseases to Infectious Disease, Sickle Cell Disease and Endometrium Disease. *Immune Netw*. **2011**; 11(6):309-323.
189. **Kim JK, Noh JH.** SIRT7 Oncogenic Potential in Human Hepatocellular Carcinoma and its Regulation by the Tumor Suppressors MiR-125a-5p and MiR-125b. *Hepatology*. **2012**, Erişim doi: 10.1002/hep.26101
190. **http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51547.** Erişim:20.10.2012
191. **Hong-Yan J, Wang YX .** MicroRNA-125b Functions as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Int. J. Mol. Sci*. **2012**; 13: 8762-8774.
192. **Liang L , Wong CM.** MicroRNA-125b suppressed human liver cancer cell proliferation and metastasis by directly targeting oncogene LIN28B2. *Hepatology*. **2010**; 52(5):1731-1740.
193. **Hayes CN, Akamatsu S.** Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle C. *PLoS One*. **2012**;7(10) Erişim: doi: 10.1371/journal.pone.0047490.
194. **Jian Xu, Chen Wu.** Circulating MicroRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in Patients With Hepatocellular Carcinoma or Chronic Hepatitis. *Molecular Carcinogenesis*. **2011**; 50:136-142.
195. **Zhao WY, Wang DD.** Role of microRNA-223 and its target gene oncogene c-myc in hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Chinese Journal of Hepatology*. **2011**;19(2):114-117.

196. **Karakatsanis A, Papaconstantinou I.** Expression of MicroRNAs, miR-21, miR-31,miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c,miR-221, miR-222, and miR-223 in PatientsWith Hepatocellular Carcinoma or Intrahepatic Cholangiocarcinoma and its Prognostic Significance. *Molecular Carcinogenesis*.**2011** doi: 10.1002/mc.21864.
197. **Queenie W, Wong L.** MicroRNA-223Is Commonly Repressed in Hepatocellular Carcinoma and Potentiates Expression of Stathmin1. *Gastroenterology*. **2008**; 135:257–269.
198. **Coulouarn C, Factor VM.** Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic propertiesmiR-122 repression is a marker of tumor progression in HCC. *Oncogene*. **2009**; 28(40):3526-3536.
199. **Fornari F, Gramantieri L.** MiR-122/Cyclin G1 Interaction Modulates p53 Activity and Affects Doxorubicin Sensitivity of Human Hepatocarcinoma Cells. *Cancer Res*. **2009**; 69(14):5761-5767.
200. **Novellino L, Rossi RL.** Circulating Hepatitis B Surface Antigen Particles Carry Hepatocellular microRNAs. *PLoS One*. **2012**;7(3) e31952. doi: 10.1371/journal.pone.0031952.
201. **Shigoka M, Tsuchida A,** Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol Int*. **2010**; 60(5):351-357.

ÖZGEÇMİŞ

21.10.1987 tarihinde Yalova ilinde doğdu. Liseyi Yalova' da tamamladı. 2005 yılında Muğla Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2009 yılında mezun oldu. 2010 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.

