

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

**HEPATİT B VİRUS İLE İLİŞKİLİ HEPATOSELLÜLER
KARSİNOMADA POTANSİYEL BİOMARKER OLAN
mikroRNA'LARIN SERUM ve DOKUDA
ARAŞTIRILMASI**

Mehmet ÇİMENTEPE

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

ADANA-2020

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

**HEPATİT B VİRUS İLE İLİŞKİLİ HEPATOSELLÜLER
KARSİNOMADA POTANSİYEL BİOMARKER OLAN
mikroRNA'LARIN SERUM ve DOKUDA
ARAŞTIRILMASI**

Mehmet ÇİMENTEPE

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TDK-2017-7564
numaralı proje olarak desteklenmiştir.**

ADANA-2020

KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan
“Hepatit B Virus İle İlişkili Hepatosellöler Karsinomada Potansiyel Biomarker Olan mikroRNA'ların
Serum ve Dokuda Araştırılması”
adlı çalışma, aşğıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

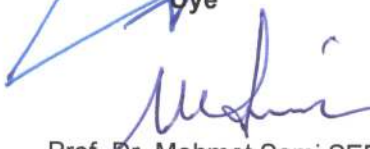
Tarihi: 10 / 04 / 2020

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Fügen YARKIN
Çukurova Üniversitesi
Başkan



Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN
Mersin Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Süheyla KÖMÜR
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Nazami DURAN
Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi
Üye



Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 10 / 04 / 2020

İMZA

Adı Soyadı

Mehmet ÇİMENTEPE

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programı
Tezin Konusu : Hepatit B Virus İle İlişkili Hepatosellüler Karsinomada Potansiyel Biomarker Olan mikroRNA'ların Serum ve Dokuda Araştırılması

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: ☒

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Fügen YARKIN

Danışmanın İletişim Bilgileri

Telefon : 05326849960

E-Posta : fugeny@yahoo.com

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon : 05327235687

E-Posta : mehmet_cimentepe@hotmail.com

Adresi : Huzurevleri Mah. 77162 Sk. Başkent Sit. A blok Kat:1
Çukurova/ADANA

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca tez konumun seçilmesinde ve hazırlanmasında, tüm çalışmalarında bana yol gösteren, engin bilgisi ve tecrübesiyle yardım ve desteğini esirgemeyen, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Fügen Yarkın'a, yetişmemde emeği geçen Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Fatih Köksal'a ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyeleri'ne saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızda klinik örneklerin toplanmasında titizlikle ve özveriyle yardım eden Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Süheyla Kömür'e, Radyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Öğretim Üyesi Hüseyin Tuğsan Ballı'ya ve Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Figen Doran'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Viroloji Bilim Dalı Laboratuvarında büyük bir keyifle birlikte çalıştığım viroloji ekibi; Gökhan Öztürk, Serap Özen, ve Huri Sökmen'e teşekkürlerimi sunarım.

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na 2211-C Öncelikli Alanlar Doktora Burs programı kapsamında doktora tezim boyunca desteğinden ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni manevi açıdan sürekli olarak destekleyen aileme ve bu uzun süreçte her zaman yanımda olarak desteğini esirgemeyen canım eşim Özge Öztürk Çimentepe'ye ve canım kızım Aysima'ya bana manevi destekleri için sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım...

Mehmet ÇİMENTEPE

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
KABUL ve ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma	4
2.3. Virusun Yapısı	5
2.4. Genom Yapısı	6
2.5. HBV Proteinleri	8
2.5.1. Yüzey Proteinleri	8
2.5.2. Kor Proteinleri	9
2.5.3. Polimeraz Protein	10
2.5.4. X Protein	11
2.6. Virusun Replikasyonu	11
2.7. Patogenez	15
2.8. Klinik Seyir	18
2.8.1. Akut HBV Enfeksiyonu	18
2.8.2. Kronik HBV Enfeksiyonu	19
2.9. HBV ve Hepatosellüler Karsinoma (Hepatocellular Carcinoma; HCC)	21
2.10. HBV ile İlişkili HCC'nin Moleküler Mekanizması	23
2.10.1. Konak Faktörleri	23
2.10.1.1. Konak Genetik Değişikliği	23

2.10.2. Çevresel Faktörler	25
2.10.2.1. Somatik Mutasyon	25
2.10.2.2. Tekrarlayan Somatik Mutasyonlar	25
2.10.3. Viral Faktörler	26
2.10.3.1. Viral DNA Yüğü	26
2.10.3.2. HBV Genotipi	27
2.10.3.3. HBV Mutasyonu	28
2.10.3.3.1. Pre/S Bölgesi Mutasyonu	28
2.10.3.3.2. Pre C/C Bölgesi Mutasyonu	28
2.10.3.3.3. Polimeraz Mutasyonu	29
2.10.3.3.4. X Mutasyonu	29
2.10.3.4. HBV DNA Entegrasyonu	30
2.10.3.5. HBx Proteini	31
2.10.3.5.1. Transkripsiyonel Transaktivatör	31
2.10.3.5.2. Sinyal Yolları	32
2.10.3.5.3. DNA Hasarı	33
2.10.3.5.4. Oksidatif Stres	34
2.10.3.5.5. İmmün Sistem	34
2.10.3.5.6. Apoptoz	35
2.10.3.5.7. Epigenetik	36
2.10.3.5.8. Kodlanmayan (Non-Coding) RNA'lar	36
2.10.3.5.9. HBx Gen Mutasyonu	37
2.11. miRNA Tarihçe	38
2.12. miRNA'ların Biyogenezi	40
2.13. miRNA ile İlişkili HBV Enfeksiyonu	42
2.13.1. HBV Enfeksiyonunda İmmün Sistemi Düzenleyen miRNA'lar	42
2.13.2. HBV Transkriptlerini Hedefleyen miRNA'lar	43
2.13.3. HBV Enfeksiyonunda miRNA Regülatörü	44
2.14. HBV ile İlişkili HCC'de miRNA'lar	46
2.14.1. miRNA'ların Düzensizliği	46
2.14.2. miRNA'ların Tümör Baskılayıcıları Üzerindeki Deaktivasyonu	47
2.14.3. miRNA'ların Onkojen Ekspresyonu Başlatması	48

2.14.4. miRNA'ların Metastazı	50
2.14.5. miRNA'lar ve Epitel-Mezankimal Geçiş	50
2.15. miRNA'ların Klinik Uygulamaları	51
2.15.1. HCC Tanısı için Biomarker Olarak miRNA'lar	51
2.15.2. HCC'nin Ayırıcı Tanısında Biomarker Olarak miRNA'lar	52
2.15.3. HCC'nin Prognozunu Belirleyicisi Olarak miRNA'lar	53
2.15.4. HBV ile İlişkili HCC Tedavisinde miRNA'lar	54
3. GEREÇ ve YÖNTEM	57
3.1. Serum Örneklerinden miRNA İzolasyonu	57
3.2. Parafinli Doku Örneklerinin Deparafinizasyonu	58
3.3. Doku Örneklerinden miRNA izolasyonu	59
3.4. miRNA'dan Komplementar DNA (cDNA) eldesi	60
3.5. miRNA'ların Real-Time PCR ile Kantitasyonu	60
3.6. Verilerin Analizi	61
4. BULGULAR	63
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	94
7. KAYNAKLAR	96
8. ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. HBV'un yapısı	6
Şekil 2. HBV'un replikasyonu	15
Şekil 3. HBV ile ilişkili HCC'nin moleküler mekanizması	23
Şekil 4. miRNA'ların biyogenezi	41
Şekil 5. HCC'nin KHB'ye göre serum miRNA'ların kat değişimleri ve p değeri. A. hsa-miR-21-5p, B. hsa-miR-122a-5p, C. hsa-miR-182-5p, D. hsa-miR-221-5p ve E. hsa-miR-223-5p.	65
Şekil 6. HCC'nin kontrol grubuna göre serum miRNA'ların kat değişimleri ve p değeri. A. hsa-miR-21-5p, B. hsa-miR-122a-5p, C. hsa-miR-182-5p, D. hsa-miR-221-5p ve E. hsa-miR-223-5p.	66
Şekil 7. HCC'nin KHB grubuna göre doku miRNA'ların kat değişimleri ve p değeri. A. hsa-miR-21-5p, B. hsa-miR-122a-5p, C. hsa-miR-182-5p, D. hsa-miR-221-5p ve E. hsa-miR-223-5p.	68
Şekil 8. HCC'nin kontrol grubuna göre doku miRNA'ların kat değişimleri ve p değeri. A. hsa-miR-21-5p, B. hsa-miR-122a-5p, C. hsa-miR-182-5p, D. hsa-miR-221-5p ve E. hsa-miR-223-5p.	69
Şekil 9. HCC'li hastaların KHB'li hastalara göre ROC analizi. A. miR-21-5p, B. miR-122a-5p, C. miR-182-5p. D. miR-221-5p ve E. miR-223-5p.	71
Şekil 10. HCC'li hastaların kontrol grubuna göre ROC analizi. A. miR-21-5p, B. miR-122a-5p, C. miR-182-5p. D. miR-221-5p ve E. miR-223-5p.	72
Şekil 11. HCC'li hastaların KHB'li hastalara göre ROC analizi. A. miR-21-5p, B. miR-122a-5p, C. miR-182-5p. D. miR-221-5p ve E. miR-223-5p.	74
Şekil 12. HCC'li hastaların kontrol grubuna göre ROC analizi. A. miR-21-5p, B. miR-122a-5p, C. miR-182-5p. D. miR-221-5p ve E. miR-223-5p.	76

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Real-time PCR bileşenleri	61
Tablo 2. Real-time PCR sıcaklık döngüleri	61
Tablo 3. Hastalara ve kontrol grubuna ait cinsiyet dağılımı, yaş ortalaması, serolojik, biyokimyasal, hormon ve histolojik bulguları	63



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Aa	Amino asit
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
AuAg	Avustralya Antijeni
Ago	Argonaute
ASO	Antisens Oligonükleotid
AR	Androgen Reseptör
ARE	Androgen Reseptor Element
AFP	Alpha Feto Protein
Bcl-2	B Hücreli Lenfoma 2
cccDNA	Covalently Closed Circular DNA
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
COOX-2	Siklooksijenaz-2
CREB	cAMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein
CTD	C Terminal Bölgesi
CTL	Sitotoksik T Hücresi
circRNA	Sirküler RNA
DNMT	DNA Metil Transferaz
DNA	Deoksiribonucleic Acid
DHBV	Duck Hepatitis B Virus (Ördek Hepatit B virus)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplazmik Retikulum
Era	Estrogen Receptor α
Enh1-2	Enhancer EI-EII

EMT	Epitel Mezenkimal Geçiş
FUT2	Fukosiltransferaz 2
GSTP1	Glutation S- transferaz pi-1
GSHBV	Ground Squirrel Hepatitis B Virus (Tarla Sincabı Hepatit B Virus)
GTP	Guanin Trifosfat
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
HBV	Hepatitis B Virus
HBcAg	Hepatitis B core Antigen (Hepatit B kor Antijeni)
HBeAg	Hepatitis B early Antigen (Hepatit B erken Antijeni)
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen (Hepatit B yüzey Antijeni)
HBxAg	Hepatitis B x Antigen (Hepatit B x Antijeni)
HCC	Hepatocellular Carcinoma (Hepatosellüler Kanser)
HCV	Hepatitis C Virus
HDAC4	Histon Deasetilaz 4
HIV	Human İmmonodeficiency Virus
HHBV	Heron Hepatitis B Virus (Balıkçıl Hepatit B Virus)
HO-1	Heman Oksijenaz-1
hOGG1	İnsan 8 Oksoguanin DNA Glikosilaz 1
JAK/STAT	Janus-Kinaz/ Sinyal Transdüserleri ve Transkripsiyon Aktivatörleri
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
KHB	Kronik Hepatit B
LHBs	Large HBs
lncRNA	Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA
MAPK	Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz

Mcl-1	Miyeloid Hücre Lösemi-1
miRNA	MikroRNA
MHBs	Middle HBs
MVB	Multi Vesiküler Gövde
NA	Nükleoz(t)id Analog
NK	Naturel Killer
NCTP	Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide
NCP	Nüklear Pore Complex
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa β
NFIβ	Nükleer Faktör I/ β
NP	Nano Partikül
ncRNA	Kodlayıcı Olmayan RNA
NQO1	NAD(P)H Kinon Oksidoredüktaz 1
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PgRNA	Pregenomik RNA
PACT	Protein Aktivatör of the İnterferon-İnduced Protein Kinase
PPARα	Peroksizom Proliferation ile Aktifleştiren Reseptör α
PDCD4	Programlanmış Hücre Ölümü 4
PTTG1	Putuitory Tümör Transforming Gene 1
PBF	Bağlanma Faktör
RC DNA	Relax Circular DNA (Relax Sirküler DNA)
RT	Reverse Transcriptase (Revers Transkriptaz)
RTK	Reseptör Tirozin Kinase
RP	Revers Transkriptase
RISC	RNA İnduced Silencing Complex

RXRα	Retinoid X Receptör α
TFIIH	Transkripsiyon Faktörü IIH
TGFγ	Dönüştürücü Büyüme Faktör γ
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNM	Tümör Lenf Nodu Metastaz
TRAIL	TNF- α ile İlişkili Apoptoz İndükleyen Ligand
TP	Terminal Protein
TRBP	Transactivation Response RNA Binding Protein
SLC10A1	Solute Carrier Family 10A1

ÖZET

Hepatit B Virus ile İlişkili Hepatosellüler Karsinomada Potansiyel Biomarker Olan mikroRNA'ların Serum ve Dokuda Araştırılması

Hepatosellüler karsinoma (Hepatocellular Carcinoma; HCC) primer karaciğer kanserin %90'ını oluşturur ve bütün dünyada en yaygın beşinci kanser ve kanserle ilişkili ölümün ikinci sebebidir. Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu HCC gelişimi için en önemli risk faktörlerinden biridir. mikroRNA'lar (miRNA'lar) tamamlayıcı mRNA'ların hem stabilitesini hem de translasyonunu etkileyerek transkripsiyon sonrası düzeyde gen ekspresyonunu düzenleyen 22 nükleotid uzunluğunda yüksek oranda korunmuş küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır. miRNA'lar düşük pH ve RNAaz'a direnç gibi koşullar altında önemli stabilite gösterdiğinden dolayı HCC'nin erken tespiti için yeni potansiyel biomarker olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu çalışmanın amacı HBV ile ilişkili hepatosellüler karsinomada potansiyel biomarker olan miRNA'ların serum ve dokuda araştırılmasıdır. Mart 2016-Aralık 2019 tarihleri arasında HBV ile ilişkili 35 HCC hastası, 35 kronik HBV hastası (KHB) ve 30 sağlıklı bireylerden alınan serum ve doku örneklerinde miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-182-5p, miR-221-5p ve miR-223-5p'nin ekspresyon seviyeleri kantitatif real-time PCR testi (miScript SYBR® Green PCR Kit, Qiagen, Germany) ile analiz edilmiştir. Serum miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-182-5p ve miR-221-5p ekspresyon seviyesi HCC'li hastalarda KHB'li hastalar ve kontrol grubuna göre upregüle iken serum miR-223-5p ekspresyon seviyesi HCC'li hastalarda KHB'li hastalar ve kontrol grubuna göre downregüle bulunmuştur. Doku miR-21-5p, miR-182-5p ve miR-221-5p ekspresyon seviyesi HCC'li hastalarda KHB'li hastalar ve kontrol grubuna göre upregüle iken doku miR-122a-5p ve miR-223-5p ekspresyon seviyesi downregüle olarak tespit edilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı bulunan serum ekspresyon seviyelerinin HCC'li hastalarda kontrol grubuna göre ROC (Receiver Operator Characteristic Curve; ROC) analizi ile tanısal değerlendirilmesinde miR-21-5p'nin AUC (Area Under Curve; AUC) değeri 0.763, miR-122a-5p AUC değeri 0.819, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.721 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.801 olarak tespit edilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı bulunan doku ekspresyon seviyelerinin HCC'li hastalarında kontrol grubuna göre ROC analizi ile tanısal değerlendirilmesinde miR-21-5p'nin AUC değeri 0.801, miR-122a-5p AUC değeri 0.629, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.706 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.560 bulunmuştur. Sonuç olarak, HCC'yi KHB ve sağlıklı bireylerden doğrulukla ayıran miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-221-5p ve miR-223-5p'nin HCC'li hastaların erken tanısı ve prognozunda potansiyel biomarker olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu miRNA'ların serum ve doku ekspresyon seviyeleri KHB'nin siroz ve HCC'ye ilerlemesinin bir göstergesi olarak kullanılabilir.

Anahtar Sözcükler: Biomarker, Hepatit B virus, Hepatosellüler karsinoma, mikroRNA, Serum, Doku

ABSTRACT

The Investigation of microRNAs as Potential Biomarkers in Serum and Tissue for Hepatitis B Virus Related Hepatocellular Carcinoma

Hepatocellular carcinoma (Hepatocellular Carcinoma; HCC) accounts for 90% of primary liver cancer and is the fifth most common cancer and the second cause of cancer-related death in the worldwide. Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the most important risk factors for HCC development. microRNAs (miRNAs) are highly preserved small non-coding RNAs of 22 nucleotides in length, which modulate gene expression at the post-transcription level, affecting both stability and translation of complementary mRNAs. Since miRNAs show significant stability under conditions such as low pH and resistance to RNAase, it has shown that it can be used as a new potential biomarker for early detection of HCC. The aim of this study is to investigate of microRNAs as potential biomarkers in serum and tissue for hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma. Between March 2016-December 2019, the expression levels of miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-182-5p, miR-221-5p and miR-223-5p in serum and tissue samples from 35 HCC patients, 35 chronic HBV patients (CHB), and 30 healthy individuals were analyzed by quantitative real-time PCR test (miScript SYBR® Green PCR Kit, Qiagen, Germany). Serum miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-182-5p and miR-221-5p expression levels were found to be upregulated in patients with HCC compared to the CHB and control group, while serum miR-223-5p expression level were downregulated in patients with HCC compared to the CHB and control group. While tissue miR-21-5p, miR-182-5p and miR-221-5p expression levels were upregulated in patients with HCC compared to the CHB and control group, the tissue miR-122a-5p and miR-223-5p expression levels were downregulated. In the diagnostic evaluation of serum expression levels found statistically significant in patients with HCC compared to the control group by ROC (Receiver Operator Characteristic Curve; ROC) analysis, miR-21-5p AUC (Area Under Curve; AUC) value of 0.763, miR-122a 5p AUC value of 0.819, miR-221-5p AUC value of 0.721 and miR 223-5p AUC value of 0.801 were detected. In the diagnostic evaluation of tissue expression levels found statistically significant in patients with HCC compared to the control group by ROC analysis, miR-21-5p AUC value of 0.801, miR-122a-5p AUC value of 0.629, miR-221-5p AUC value of 0.706 and miR-223-5p AUC value of 0.560 were found. In conclusion, the serum and tissue expression levels of miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-221-5p and miR-223-5p, which differentiate HCC from CHB and healthy individuals with accuracy, have been shown to be used as potential biomarkers in the early diagnosis and prognosis of HCC patients. Serum and tissue expression levels of these miRNAs can be used as an indicator of the progression of CHB to cirrhosis and HCC.

Key Words: Biomarker, Hepatitis B virus, Hepatocellular carcinoma microRNA, Serum, Tissue

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yirmi yılda birçok ülkede Hepatit B Virus (HBV) enfeksiyonuna karşı uygulanan evrensel aşılama kampanyalarına rağmen bu enfeksiyon küresel bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. HBV enfeksiyonu sadece fulminan, subfulminan ve kronik hepatit ile sonuçlanmayıp, aynı zamanda siroz ve hepatosellüler kanserin (Hepatocellular Carcinoma; HCC) gelişimine de yol açar. Kronik hepatitli hastalar hastalık aktivitesinin derecesine bağlı olarak HBeAg/anti-HBe'ye (Hepatitis B early Antigen; HBeAg) göre 5 yıllık bir kümülatif ilerleme olasılığı %8-20 arasında değişen her 100 kişide yılda %1-5 oranında karaciğer sirozu geliştirir¹. HBV'a bağlı karaciğer sirozu olan hastalarda HCC insidansı yaklaşık 3.7 kişi/yıl olarak tahmin edilmektedir². Bütün dünyada yaklaşık 257 milyon kişi kronik HBV geçirmektedir. HBV komplikasyonları sebebiyle her yıl yaklaşık 887.000 kişi ölmektedir³. Kronik HBV enfeksiyonunun HCC'ye sebep olduğu çeşitli mekanizmalar ile tanımlanmıştır. HBV enfeksiyonunun ardından enfeksiyonla mücadelede sağlam bir T hücresi immün cevabı ortaya çıkar. Bu durum kayıp hepatositleri telafi etmek için hepatosit nekrozu, inflamasyon ve bunun sonucu olarak da rejenerasyona sebep olur. İmmün sistem HBV'u temizleyemediğinde sürekli nekroz-inflamasyon-rejenerasyon döngüleri oluşur. Hepatositlerin bu şekilde sürekli çoğalması muhtemel epigenetik değişikliklerin yayılmasına, onkogenik mutasyonların ve bunun sonucunda ortaya çıkan genomik kararsızlıkla birlikte telomer kısalmasına olanak sağlar. HCC demografik (erkek cinsiyet, yaşlılık), viral ve çevresel faktörlerine bağlı olarak siroz olmayan kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda da daha düşük bir sıklıkta gelişebilir⁴.

HCC karaciğerin primer kanseridir. Dünyadaki en yaygın 5. kötü huylu kanser olarak yer alır ve kanser ile ilişkili ölümlerin 2. sebebidir. HCC hastalarında kötü prognoz temel olarak hastalığın geç tanısına bağlıdır. Başlıca risk faktörleri arasında HBV, Hepatit C virusu (HCV), aflatoksine maruz kalma, alkolik hastalık ve alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı bulunur. HCC hastalarının büyük çoğunluğu (%70-90) karaciğer sirozu geçirmektedir⁵. üç HCC hastasından yalnızca 2'si ilerlemiş karsinom zamanında teşhis edilir⁵. HCC'nin erken aşamasında özellikle kritik genlerin ekspresyon profillerinin zıt olarak moleküler bir seviyede teşhis edilmesi kritik öneme

sahiptir. HCC hepatik ultra ses görüntüleme ve serum α -fetoprotein (AFP) kombinasyonu kullanılarak teşhis edilir. Bununla birlikte bu biomarker düşük duyarlılık ve özgüllük nedeniyle HCC'nin kesin erken tanısı, prognozu ve tedavi sınıflandırması ihtiyaçlarını karşılamamaktadır⁶.

mikroRNA'lar (miRNA) hedef mRNA'ların 3' çevrilmemiş bölgesi (UTR) ile diziye spesifik etkileşimler yoluyla mRNA bozulmasını teşvik ederek veya protein translasyonunu baskılayarak, gen ekspresyonunu modüle eden 20-25 nükleotid (nt) içeren endojen küçük kodlayıcı olmayan RNAlardır. miRNA'ların gelişim, apoptoz, çoğalma ve farklılaşma gibi çeşitli fizyolojik işlemlerde önemli roller oynadığı bilinmektedir. miRNA'ların ekspresyon düzensizliği kanser dahil birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir⁷. Son kanıtlar anormal epigenetik modifikasyonlar dışında miRNA ekspresyonunun düzensizliğinin ayrıca tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesinin eşlik ettiği onkogenlerin anormal aktivasyonuna da katkıda bulunabileceğini açıkça göstermiştir. miRNA'lar karaciğer hücrelerinde HBV veya HCV girişine ve replikasyonuna ayrıca hücre döngüsü kontrol noktaları, apoptoz ve hücre göçünü belirleme gibi diğer birçok temel hücresel fonksiyonları etkilemektedir⁸.

Klinik açıdan bakıldığında anormal miRNA'lara dayanan HCC'nin teşhisi ve tedavisi büyük potansiyele sahip gibi görünmektedir. Anormal miRNA ekspresyonunun HBV ile ilişkili hepatokarsinogenez sırasında erken bir olay olduğu göz önüne alındığında tümörün metastaza geçmeden önce doğru bir tanı elde etmek mümkündür. Hedeflenen miRNA tespit teknolojisinin gelişmesiyle birlikte miRNA seviyelerini geri kazanmaya veya miRNA fonksiyonlarını engellemeye dayalı HBV ile ilgili hastalık tedavilerinin yakın gelecekte kliniğe başarıyla ulaşması beklenmektedir⁹. Bu çalışmamızın amacı HBV ile ilişkili hepatosellüler karsinomada potansiyel biomarker olan mikroRNA'ların serum ve dokuda araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Yüzyıllarca hepatit bir gizem olarak kalmış ve anlaşılması çözülene kadar dalgalar halinde gelmiştir. İlk açıklama Sümerce'de (3. bin yıl B.C.) tıbbın ilk el kitabı olan kil tabletlerinde sarılık tanımıyla bulunmuştur. Etiyolojik ajan karaciğere saldıran 'Ahhazu' adı verilen bir iblis olarak tanımlanmıştır. Hipokrat (460 ila 375 B.C.) 11 gün içinde ölen hastalarda fulminan gidişi içeren epidemik sarılığın ilk klinik özelliklerini tanımlamıştır. Böylece "sarılık" kelimesi ilk olarak Hipokrat tarafından bulunmuştur¹⁰.

Yunanlılar ve Romalılar tarafından sarılık kötü bir şekilde tarif edilmiş ancak muhtemelen sıtma ve leptospiroz gibi salgınlarla karıştırılmıştır. Orta çağlarda, sarılık iyi bir şekilde tanınmıştır. Hastalar "saf" olarak kabul edilmiş ve bu nedenle hastalardan kaçınılmış ve izole edilmiştir¹⁰.

Nitekim, 18. yüzyılda askeri kampanyalar sırasında ve özellikle 1799'da Saint-Jean-d'Acre Kuşatması'nda ve 1870'de Paris'te birçok salgın rapor edilmiştir. Amerikan İç Savaşı'nda 1861 yılında 52.000 hepatit vakası gelişmiştir. ikinci Dünya Savaşı'nda ise hepatit kaynaklı tahmini ölüm 16 milyon vaka olmuştur. Tüm bu vakalarda, dikkatli tarifler bu hastalığın spesifik epidemiyolojik yönlerini tanımlamaya yardımcı olmuştur. En dikkat çeken vaka grubu 1885'te, Bremen tersanesi salgını üzerinde çalışan Lührman sadece çiçek hastalığına karşı aşı olan mağdurların hepatit geliştirdiğini ancak aşı olmayan çalışanların hiçbirinin hepatit olmadığını gözlemlemiştir. Enfeksiyon kaynağının muhtemelen çiçek aşısı ile uygulanan insan lenfi olduğu sonucuna varmıştır. Amerika Birleşik Devletleri Ordu'sunda 1942'de normal insan plazması ile kontamine olan sarı ateş aşısının uygulanmasından sonra 56.000 hastada büyük bir hepatit salgını meydana gelmiştir. Buna dayanarak Mac Callum 1947'de iki hepatit türü arasındaki ilk tarihsel ayrımı önermiştir. Hepatit tip A çocuklara dışkı ile kontamine su, içecek veya yiyecek ile bulaşır ve kronikleşme olmamaktadır. Hepatit tip B ise genellikle tedavi amacıyla verilen kan ya da serum verilmesi ile veya kişiden kişiye inokülasyon sonucu bulaşmaktadır¹¹.

Amerikalı doktor ve genetikçi olan Baruch Blumberg 1963 yılında Ulusal Sağlık Enstitüsü'nde lipoproteinlerin polimorfizmi üzerine çalışırken poli-transfekte edilmiş bir hemofilik serum ile bir Avustralya aborjinininki arasında bir immünodifüzyon jelindeki alışılmadık bir reaksiyon gözlemlemiştir. Blumberg bulduğu bu yeni antijene Avustralya antijeni (Avustralya Antigen; AuAg) adı vermiştir. Blumberg'in arkadaşı Harvey Alter'in 1963 yılında Avustralya'lı birçok yerlinin serumunda "HBsAg" (Hepatitis B surface Antigen; HBsAg) olarak bilinen "AuAg" keşfetmesiyle viral hepatitler tarihinde yeni bir dönem başlamıştır. Blumberg 1967'de AuAg'nin viral hepatit ile bağlantılı olduğunu öne sürmüştür. Kısa süre sonra 1968'de New York Kan Merkezindeki Alfred Prince immüno-elektroforetik tekniği kullanarak özellikle serum hepatit antijeni olarak adlandırdığı posttransfüzyon hepatiti ile ilişkili bir serum antijeni tarif etmiş ancak çok geçmeden AuAg ile benzer olduğunun farkına varmıştır. David Dane 1970'de AuAg'in immun komplekslerini elektron mikroskobu altında incelemesi sırasında yaklaşık 42 nm çapında HBV virionunun taşıyan "Dane" partikülü olarak adlandırılan partiküller bulmuştur. Shalom Hirschman 1971 yılında saflaştırılmış AuAg preparasyonlarının DNA polimeraz ve retrovirus gibi revers transkriptaz (RT) içerdiğini göstermiş ve HBV genomunun saptanmasına yol açmıştır. William S. Robinson 1973 yılında HBV'da endojen DNA polimeraz aktivitesi olduğunu ve 1974 yılında ise bu aktivitenin HBV'deki viral DNA'dan kaynaklandığını göstermiştir¹⁰⁻¹².

2.2. Sınıflandırma

HBV, replikasyon döngüsünde revers transkriptaz kullanan kısmen çift iplikli zarflı DNA virusu olup Hepadnaviridae ailesinin prototip bir üyesidir. Bu sebeple HBV hayvanlarda bulunan birçok retrovirus ve bitkilerde pararetroviruslere benzer. Bu ailede bulunan virusların virus yapısı, aminoasit uzunluğu, gen sayısı, konak faktörü ve antijenik reaksiyonları dikkate alındığında memeli hayvan virusları orthohepadnavirus ve kanatlı hayvan virusları ise avihepadnavirus olmak üzere iki cins altında sınıflandırılmaktadır.

Orthohepadnavirus cinsinde dağ sıçanı HBV (woodchuck HBV; WHBV), tarla sincabı HBV (ground squirrel HBV; GSHBV) ve pekin ördeği HBV (pekin duck HBV;

PDHNV), orangutanlar, goriller, gibbonlar ve şempanzeleri enfekte eden birçok virus tespit edilmiştir. Daha sonra memelilerde ve kuşlarda HBV'a benzer çok sayıda yeni virus bulunmuştur. Avihepadnavirus'lar; duck (ördek) HBV (DHBV), ross goose HBV, heron (balıkçıl) HBV (HHBV), ve stork HBV snow goose HBV'ünü içermektedir. Bu viruslar Kuzey Amerika'da yaşayan balıkçıların %50 kadarında görülmüştür¹³.

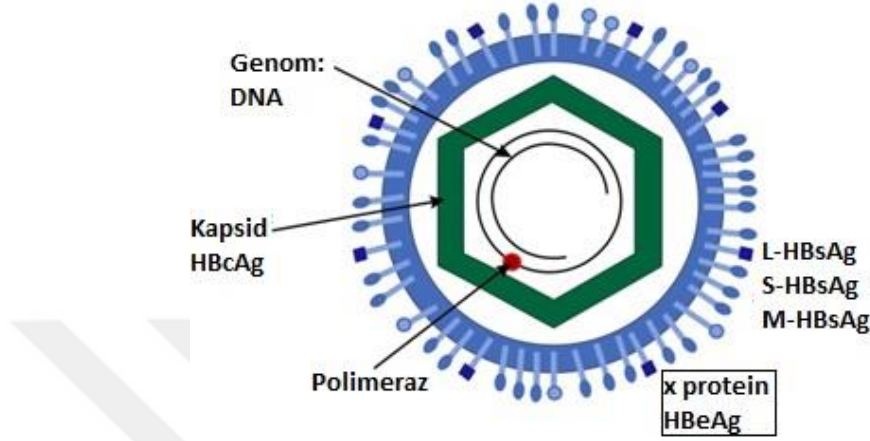
2.3. Virusun Yapısı

HBV hepatotropik, zarflı yapıda ve kısmen çift sarmallı, sirküler en küçük DNA virusu olup genomu yaklaşık olarak 3200 nükleotid uzunluğundadır. HBV Hepadnaviridae ailesinin üyeleri içerisinde insanlarda enfeksiyon oluşturan tek tür'dür.

HBV ile enfekte olmuş hastaların serumunda elektron mikroskobu ile gözlenen üç farklı viral yapı görülür. Lipid yapıda çift tabakalı 42 nm çapında sferik olan Dane partikülleri bulaşıcı HBV virionları, MHBs (Middle HBs) ve LHBs (Large HBs) içerir. Dane partikülü tüm virionu temsil eder. Dane partikülünün kor bölgesi küçük, dairesel, kısmen çift sarmallı bir DNA molekülü ve nükleokapsid ile çevrili olan viral DNA polimerazı içerir. Birleştirilmiş hepatit B kor antijenleri (Hepatitis B core Antigen; HBcAg) HBsAg içeren bir lipid zarfla kaplı nükleokapsid oluşturur. Bu durum viral enfektivite için lipid zarfın kolesterol yönünden zengin olması gereklidir¹⁴ (Şekil 1).

HBV ile enfekte olmuş bir hücre enfeksiyöz olmayan subviral partiküller çok az LHBs, değişken miktarlarda MHBs ve SHBs (Small HBs) üretir. Bu subviral partiküller enfekte bir bireyin serumundaki bulaşıcı HBV partiküllerden 10.000 kat daha yüksek bir konsantrasyona ulaşabilir. Subviral partiküller iki formda oluşur. Bunlardan birisi SHBs'den oluşan 25 nm'lik sferik partikül ile küçük miktarlarda MHBs ve LHBs'den oluşan 22 nm filamentöz partiküllerdir. Bu partiküller HBV genomu olmayıp sadece konak lipid ve HBsAg'den oluşur. Bu yüzden filamentöz ve sferik partiküller non-enfeksiyözdür. HBV'un neden bulaşıcı viryonların seviyesine kıyasla bu kadar fazla subviral partiküller ürettiği bilinmemektedir ancak birçok hipotez öne sürülmüştür. Örneğin subviral partiküllerin fazlası nötrleştirici antikorları bulaşıcı partiküllerden uzağa yönlendirmek için hareket ettiğini ve subviral partiküllerin uzun süreli bir kronik

enfeksiyonu sürdürmek için gerekli olan immün toleransı uyarmada rol oynadığı bildirilmiştir^{15,16}.



Şekil 1. HBV'un Yapısı

2.4. Genom Yapısı

HBV genomu yaklaşık 3200 nükleotid uzunluğunda kısmen çift sarmallı sirküler DNA molekülüdür. HBV'un nükleokapsid yapısı 27 nm çapında 240 viral kapsid proteininin bileşiminden oluşan ikosahedral yapıdadır ve viral genom DNA'nın negatif zincirin 5' ucuna kovalent olarak bağlanmış viral polimeraz enzimi içerir. HBV genomunun eşsiz özelliklerinden biri iki zincirin asimetrik yapısıdır. Negatif zincir genom uzunluğuna sahip olmasına rağmen tamamlayıcı pozitif zincir farklı uzunluklarda olabilir¹⁷.

HBV genomu kısmen üst üste binen, 7 viral protein kodlayan 4 adet açık okuma çerçevesinden (Open Reading Frame; ORF) oluşmaktadır. Bunlar ORF-P, ORF-S, ORF-C ve ORF-X'dir. Kodlama bölgelerinin üst üste binen yapısı %150 verimle HBV genomunun kullanımını kolaylaştırmaktadır. S ve C genlerinin tek bir ORF'si olmasına rağmen farklı başlangıç kodonlarına sahip oldukları için fonksiyonel olarak farklı gen ürünlerini sentezleyebilirler. ORF-S ve C sırasıyla 5' ucunda pre-S (pre-S1 ve pre-S2) ve pre-C bölgelerine uzanır. Üst üste binen bölgelerde 4 promotör (pre-C / C, pre-S1 / S ve X) ve 2 arttırıcı olan düzenleyiciler vardır ve bunlar, farklı kodonlarda serbest uçları

olan en az 5 farklı mRNA tarafından kopyalanan 7 farklı proteinin ekspresyonuna izin verir. Direkt tekrar dizileri (DR1 ve DR2) olarak adlandırılan 11 bazlık iki yinelenen bölge negatif ve pozitif zincirlerin 5' ucunda bulunur ve viral DNA replikasyonunda kritik bir rol oynarlar. Enh1 ve Enh2 olarak belirtilen iki artırıcı (Enhancer; EI ve EII) dizisi viral gen ürünlerinin karaciğere spesifik ekspresyonlarını sağlar. mRNA'lar transkript uzunluklarına göre 3.5 kb (prekor-kor ve pregenomik mRNA), 2.4 kb (L yüzey mRNA), 2.1 kb (M ve S yüzey mRNA'ları) ve 0.7 kb (X mRNA) olarak tanımlanmaktadır. Genomik transkriptler ise prekor, kor ve polimeraz için mRNA olarak işlev görür. Hem koru hem de polimerazı kodlayan genomik transkript çok fonksiyonlu olup pregenomik RNA (pgRNA) olarak adlandırılır. PgRNA HBV replikasyonu için şablondur ve HBV DNA genomunu oluşturmak için ters kopyalanır. HBV RNA transkriptleri aynı poliadenilasyon bölgesini paylaşır ve daha küçük transkriptlerin her biri, daha büyük transkriptlerin her birinin 3' ucunu oluşturur. Bu, HBx transkriptinin dizisinin tüm HBV mRNA transkriptlerinin 3' ucunda bulunduğu, en büyük transkript diğer transkriptlerle paylaşılmayan diziyi içeren tek viral transkript olduğu anlamına gelir.¹⁸

HBV yüzey proteinlerini kodlayan (HBsAg) ORF-S bölgesi yapısal ve işlevsel olarak pre-S1, pre-S2 ve S ile 3 farklı AUG başlangıç kodonuna sahip bölgelere ayrılır. Reseptör bağlanmasında major rolü olan LHBs pre-S1, pre-S2 ve S bölgelerini içeren pre-S1mRNA translasyonunun sonucu olarak sentezlenirken MHBs ve SHBs proteinleri pre-S2 /S mRNA ve S mRNA translasyon sonucu olarak sentezlenir. HBV yüzey proteinleri 3 yüzey proteininin hepsinde bulunan S bölgesine hücrel membran ile bağlanan integral membran proteinleridir ve Asn-146 N-glikozilasyon bölgesinde bulunur. Pre-S2 bölgesinde MHBs'lerde kullanılan ancak LHBs'lerde kullanılmayan Asn-4 glikosilasyon bölgesi vardır. S bölgesi virus bağlama ve bulaşıcılık için kritik olan S proteinini kodlar. Mistik asit L proteininin pre-S1 N terminal ucundaki glisine bağlanır¹⁹.

ORF-C bölgesi prekor ve kor bölgelere sahip nükleokapsidin yapı taşı olan kor antijenini (HBcAg) ve prekor veya kor bölgelerde translasyonu başlatan ve kana sekrete edilen early (erken) antijenini (HBeAg) kodlar. Kor proteini kendine özgü bir bağlanma özelliği gösteren, RNA bağlanma aktivitesine sahip C-terminali arginin bakımından

zengin ve ayrıca oldukça bazik aminoasit kümelerine sahip kapsid benzeri bir yapı oluşturur. Prekor ORF posttranslasyonel modifikasyon ile HBeAg sekresyonuna neden olan prekor-kor proteini kodlarken pregenomik mRNA, kor ve polimerazın salgılanmasına da neden olur. Viral replikasyon için gerekli olmamasına rağmen HBeAg persistan enfeksiyon gelişimi için immün toleranslı olarak hareket eder. HBeAg düzeyi doğal ilerlemede kendi başına veya tedavi sırasında azalırsa yüksek replikasyon durumdan düşük replikasyon aşamaya geçmenin bir işareti olabilir¹⁹⁻²¹.

ORF-P bölgesi büyük bir protein olan polimerazı kodlar ve dört işlevsel alana bölünmüştür. Aynı zamanda pregenomik mRNA revers transkriptaz ile virus replikasyonu için sentezlenen yeni nesil viral DNA genomu için bir kalıp görevi görür. HBV polimeraz negatif DNA zinciri sentezinin başlangıcında revers transkripsiyonda ve pregenomik RNA yıkımı sırasında rolü olan çok fonksiyonlu bir enzimdir. HBV polimeraz proteini terminal protein bölgesinden, spacer bölgesinden, revers transkriptaz (RNA'ya bağlı DNA polimeraz) bölgesinden ve RNAaz H bölgesinden oluşur²⁰.

ORF-X bölgesi HBV ile ilişkili karaciğer kanserine neden olduğu düşünülen ve çeşitli gen düzenleyici fonksiyonlara sahip mRNA translasyonu sonucunda HBxAg (Hepatitis B x Antigen; HBxAg) proteinini kodlar. HBx proteini sinyalleme, transkripsiyonel aktivasyon, DNA onarımı ve protein degradasyonunun inhibisyonu dahil olmak üzere HBV replikasyonunda rol oynar. Ayrıca HBxAg'in in vivo da HBV enfeksiyonu için gerekli olduğu ve HBV'un onkojenik potansiyeline katkıda bulunduğu bildirilmiştir¹⁹⁻²¹.

2.5. HBV Proteinleri

2.5.1. Yüzey Proteinleri

HBV 3 farklı yüzey antijeni olmak üzere viral zarfı oluşturan üç yüzey proteinini kodlar. En küçük zarf proteini 24 kD ağırlığında 226 amino asit (aa) uzunluğunda ve iki uzun zarf proteininin paylaşılan bir C-terminal bölgesini oluşturur. MHBs 31 kD ağırlığında pre-S2 olarak bilinen 55aa N terminal uzantısına sahip S dizisini içerir. Zarf proteinlerinin en büyüğü olan L proteini 39 kD ağırlığında S, pre-S2 ve pre-S1 olarak

bilinen 108 aa veya 119 aa uzunluğunda N-terminal uzantısını içerir. MHBs ve SHBs S promoteri tarafından, LHBs ise pre-S1 promotörü tarafından kontrol edilen kendi mRNA transkriptiyle kodlanır¹⁷.

Zarf proteinleri transmembran konfigürasyonlarını elde ettikleri endoplazmik retikulum (ER)'da sentezlenir. Üç proteinin tümü aynı C-terminal dizisi içerdiğinden bu bölgenin transmembran topolojisi üç proteinin tamamında aynıdır. Spesifik olarak bir N-terminali sinyal dizisi S'nin ER zarına yerleştirilmesini başlatır, ardından aşağı yönde peptid dizisini ER lümenine iten başka bir sinyal gelir. Bu sinyalin üstündeki dizi sitosol ile birlikte transmembran alanı olarak görev yapan sinyal alanında kalır. Bu yönelim iki döngü oluşturur; 23-79 aa arasındaki bir döngü sitosolik tarafta kalırken diğer 99-169 aa arasındaki döngü ER lümeninde kalmaktadır. Önemli olan luminal bölge HBsAg'nin ana konformasyonel epitopunu içerir ve tüm S protein gruplarının neredeyse yarısında glikosile edilir. Membranın tomurcuklanması bir kez meydana geldiğinde bu epitoplar viral partiküllerin dış yüzeyinde bulunur. MHBs'nin topolojisi ER lümeninde pre-S2'nin varlığı dışında S ile aynıdır^{22,23}.

LHBs'nin temel özelliği N-terminal alanının lokalizasyonunda değişiklik göstererek iki şekilde bulunmasıdır. LHBs'nin birinci konformasyonunda pre-S1 ve pre-S2 alanları sitozolde bulunur. LHBs'nin bu şekli kapsidlerin bağlanması ve HBV viryonlarının montajı için gereklidir. LHBs'nin ikinci konformasyonunda N-terminali ER lümeninde bulunur ve sonuç olarak viral partiküllerin yüzeyine maruz kalır. Böylece LHBs hepatositlerin enfeksiyonunda rol oynar¹⁷.

Yüzey antijen proteinlerinin temel işlevi HBV zarfı oluşturmaktır. HBV ile enfekte olmuş bir hücreden viral partiküllerin 3 farklı formu salgılanır. SHBs yüksek miktarda salgılanır ve viral zarfın çoğunu oluşturur. LHBs ve MHBs ise eşit miktarda salgılanır ve tüm yüzey proteinlerinin %30'unu oluştururlar.

2.5.2. Kor Proteinleri

HBcAg 21 kD ağırlığında viral replikasyon için gerekli nükleokapsidin temel bileşenidir. Hücrelerde eksprese edildiğinde kor esas olarak çözünür dimer veya T=3

yada T=4 ikosahedral kapsid olarak bulunur. Dane partikülden izole edilen olgun nükleokapsidlerin yaklaşık %95'i, 120 dimerden oluşan T=4 kapsidleri içerirken geri kalan %5'i, 90 dimerden daha küçük T=3 kapsidlerinden oluşur. Kor pgRNA'dan çevrilir ve korun ilk 149 aa'sı montaj bölgesini oluşturur, bu durum in vitroda kapsid oluşumu için yeterlidir. Kalan 34-36aa, arginin bakımından zengin C-terminal bölgesini (C-terminal domain; CTD) oluşturur. CTD çeşitli aa'lerin fosforilasyonu ve HBV yaşam döngüsünün çoklu aşamalarını düzenler. Kor protein potansiyel olarak kovalent olarak kapalı dairesel DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA) üzerindeki nükleozomların aralığını düzenlemek için HBV'daki cccDNA'ya bağlanır. Ayrıca CTD pgDNA paketlemesi için gerekli olup kor proteini ayrıca revers transkripsiyonun başlatılmasında ve olgun nükleokapsidin zarflanmasında aktif rol oynar¹⁷.

HBeAg HBV prekor genin (pre-C dizisi ve C geni) translasyonu sonucunda oluşan 1972 yılında Magnius ve Espmark tarafından keşfedilen proteindir. Genomik transkript tarafından kodlanan proteinlerden biri olarak genomik promotör ekspresyonunu harekete geçirir. Kor proteinin bir parçası olan HBeAg HBV replikasyonunun önemli bir belirteçidir ve serum HBeAg seviyelerinin genellikle viral titre ile korele olduğu düşünülmektedir. Ayrıca HBeAg pregenomun revers transkripsiyonu için polimeraz aktivitesinin düzenlemesi ve pgRNA'nın kapsidasyonu için gerekli nükleik asit bağlama aktivitesine sahiptir^{24,25}.

2.5.3. Polimeraz Protein

HBV'un 90 kD ağırlığında 838 aa uzunluğundaki polimeraz proteini 3 fonksiyonel alandan ve değişken bir aralık bölgesinden oluşur. N-terminali genom replikasyonunun başlatılmasında birçok özelliği olan terminal protein (TP) bölgesidir. pgRNA, RNA paketleme ve protein oluşumuna P bağlanmadaki önemli rolüne rağmen bu bölge eşsiz bir alandır. Değişken aralık TP alanını RT bölgesinden ayırır. Değişken aralığın C-terminal ucundaki 3 sistein kalıntısı ile RT bölgesinin N-terminali tarafındaki dördüncü sistein kalıntısını RT ve polimeraz fonksiyonu için önemli olduğu düşünülmektedir. RT bölgesi DNA genomunun negatif zincirini oluşturmak için pgRNA'yı revers transkribe ederek ve sonradan DNA'nın pozitif

zincirinin sentezi için negatif zincirinin bir şablon olarak kullanılmasıyla genom replikasyonundan sorumludur. Son bölge olan RNase H DNA genomunun negatif zincirin sentezi sırasında pgRNA şablonunun parçalanmasından sorumludur. RNase H aktivitesi için önemli olan metal iyonu bağlanmasının koordinasyonu 4 korunmuş karboksilat ile sağlanır. RNase H bölgesinin çalışmaları da saflaştırılmış rekombinant RNase H bölgesi, in vitro'da fonksiyonel olduğu ve polimeraz bölgesinin RNase H aktivitesi pgRNA paketlemesi için önemli olduğunu göstermiştir¹⁷.

2.5.4. X Protein

HBx antijeni 17 kDa ağırlığında 154 aminoasitten oluşan en küçük HBV proteinidir. HBx'in in vivo da viral replikasyon için gerekli olduğu belki de viral patogeneze katkıda bulunduğu fikri ortaya çıkmıştır. Birçok çalışmada viral ve konak gen ekspresyonu DNA hasarı onarımı, Ca^{2+} sinyalleşme, hücre döngüsü, apoptozis ve otofajinin düzenlenmesinde HBx'in rolü olduğunu göstermiştir. HBx'in DNA bağlama aktivitesine sahip olduğuna dair kanıt olmadığı için HBx'e atfedilen çeşitli diğer viral veya hücrel etkiler için muhtemelen önemli olan konak protein etkileşimleri yoluyla gen ekspresyonunu etkilediği düşünülmektedir. HBx ekspresyonunun artması konak hücre sinyal transdüksiyonu, transkripsiyon ve proliferasyondan sorumlu olup viral replikasyonu artırarak kronik HBV'a ve HCC'ye neden olur^{17,26}.

2.6. Virusun Replikasyonu

Viral giriş hepatoselüler tropizmde ve tür spesifitesinde önemli bir rol oynar ve konak ile etkileşime giren ilk adımdır. Viral giriş koruyucu immun cevap ve aşı gelişimi için konak nötralize edici antikorlar için temel hedeftir. Enfeksiyonun başlatılmasındaki ilk adım olgun Dane partikülünün dış zarf üzerindeki hepatosite spesifik pre-S1 antijeni ile hepatositler üzerindeki heparan sülfat proteoglikanlar arasındaki düşük afiniteli reversible bağlanma ile başlatılır. L zarf proteininin Pre-S1 bölgesi reseptöre bağlanmasında anahtar faktördür. NTCP (Sodyum Taurokolat Cotransporting Peptid) olarak adlandırılan bu yeni peptid virus için giriş reseptörüdür. Yan ve ark. vücut da

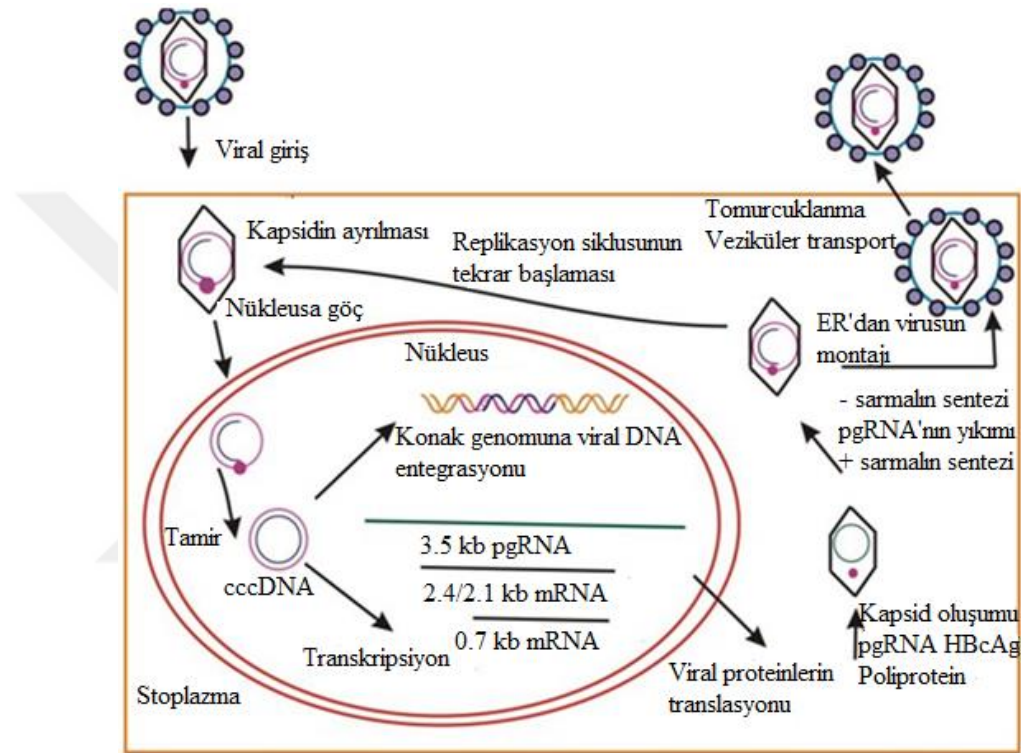
safr tuzu taşınmasında rol oynayan NTCP'nin karaciğerde ve HBV giriş reseptörü olarak çoklu transmembran taşıyıcısında eksprese edildiğini göstermiştir. NTCP katı taşıyıcı ailesinin (SLC10) bir üyesi olan SLC10A1 (Solute Carrier Family 10A1) olarak da bilinir. SLC10 ailesinin SLC10A1-7 olmak üzere 7 üyesi vardır. NTCP temel olarak hepatosit membranında yer alır ve karaciğerde portal dolaşımın oluşması için konjugat safr tuzlarının ilerlemesinde önemli rol oynar. Virusun L-HBsAg'i spesifik ve geri dönüşümsüz olarak virusa özgü pre-S1 reseptörüne bağlanır ve bu adım L-proteininin miristoillenmiş N-terminalinin açığa çıkmasına neden olan virusun aktifleşmesini gerektirir. LHBs proteininin pre-S1'in 2-48 aa bölgesi HBV enfeksiyonunun gelişiminde major rol oynadığı bilinmektedir. Anti-pre-S1 monoklonal antikorları HBV'nin hücreye bağlanmasını bloke ederek in vivo'da HBV enfeksiyonunu nötralize edebileceği gösterilmiştir. Benzer şekilde HBV enfeksiyonunun bu bölgeyi taklit edebilen anti-pre-S1 antikorı Myrcludex gibi sentetik peptitler tarafından önlenebileceği de gösterilmiştir. Miristolasyonun kesin rolü hala açık olmasa da reseptör kompleksinin membranına açıl zincirinin insersiyonu ile reseptör tanımayı artırabilir. Son zamanlarda ferritin hafif zinciri ve skuamöz hücreli karsinom antijeni 1 (SCCA1) HBV hücresel bağlanmasında ve hepatositlerin girişinde yardımcı reseptörler olarak tanımlanmıştır^{17,27,28}.

HBV'un giriş yollarının hem endositoz hem de virus zarfının plazma membranına füzyonuyla farklı mekanizmalara sahip olduğu öne sürülmüştür. Virus spesifik reseptöre bağladıktan sonra virion endositoz ile konak faktörler sayesinde hepatosite girer. Caveolin, Clathrin veya makropinositoz aracılı endositozun deney sistemine göre ve viral internalizasyon sırasında kullanılan hücre tiplerine göre ortaya çıkabileceği gösterilmiştir. Viral zarf endositozdan sonra plazma membranına veya endozom membranına füzyon olduğunda viral kapsid sitoplazmaya girer. HBV enfeksiyonunun gelişimi endozom biyogeneğinde etkili olan Rab5 ve Rab7 (GTPazlar) gibi konak faktörlerin ekspresyonuna bağlıdır^{17,20}. Kısmi çift sarmallı relaks sirküler DNA (relax circular DNA; RC DNA) içeren viral nükleokapsid, HBV endositoz yoluyla hepatosit çekirdeğine ulaşmadan önce sitoplazmaya salınır. Kapsidin taşınması sitoplazmada hücresel mikrotübüllerle etkileşimi ile gerçekleşir²⁸. Kapsid rcDNA'sını nükleer por kompleksi (Nuclear Pore Complex; NPC) sayesinde çekirdeğe taşır. Bu taşıma kapsid proteininin C-terminalindeki nükleer lokalizasyon sinyali ile nükleer

import reseptörleri (importin- α ve β) arasındaki ilişki ile gerçekleşir²⁹. Nükleer membran üzerinde mikro tüpler boyunca taşınan nükleokapsidin birikmesi NCP ve adaptör proteinleri arasındaki etkileşimi artırır. Nükleokapsid NPC sepetine tutunduktan sonra kapsidin çözülmesi tamamlanır ve rcDNA nükleoplazmaya salınır. Viral polimeraz pozitif rcDNA zincirini tamamlar. Negatif zincirin 5 'ucunda bulunan polimeraz pozitif zincir sentezi için kullanılır. Kısa RNA primeri DNA'nın pozitif ipliğinin sentezi için kullanılır. Daha sonra hem polimeraz hem de kısa RNA primeri proteinazlar gibi konağın hücrel enzimleri sayesinde uzaklaştırılır. Pozitif zincir tamamlandıktan sonra negatif zincirle eşleşir ve sirküler süper-sarmal molekülün her iki ucu da kovalent olarak bağlanırlar. cccDNA molekülü histon ve histon benzeri olmayan proteinleri içerir ve bir ipte dizilmiş boncuklar gibi kromatin benzeri bir yapıda düzenlenir. cccDNA tüm viral mRNA'ların transkripsiyonu için şablon olarak görev yapan mini kromozom olarak adlandırılırlar. cccDNA tüm viral RNA sentezini viral replikasyonunu gerçekleştirmek ve protein üretimi için tüm hücrel transkripsiyonel mekanizmaları kullanır. Transkripsiyon olayı konak transkripsiyon faktörleri (CREB, STAT1 ve STAT2)kromatin düzenleyici enzimler (PCAF ve HDAC1), hepatosit nükleer faktörleri ve X proteini gibi viral faktörlerle düzenlenir^{28,30}. Temel 4 ORF bölgesi viral promotörleri ile etkileşime girerek viral gen ekspresyonunu düzenlenir. mRNA'lar ortak bir poliadenilasyon sinyali kullanır. Büyüklükleri 3.5, 2.4, 2.1 ve 0.7 kb olan viral mRNA'ların stabilizasyonu, işlenmesi ve nükleer taşınımı konak faktörlerden kaynaklanır. Hücrel tipe bağlı protein/nükleer export faktörü-1'in (TAP/NFX1) ve HBcAg'nin HBV pregenomik RNA'nın sitoplazmaya taşınmasında rol oynadığı gösterilmiştir. Bu RNA'lar viral proteinlerin translasyonu için stoplazmaya geçerler. HBeAg veya nükleokapsid proteini 3.5 kb pgRNA'dan üretilir, çözünebilir ve sekresyonu mümkün olan HBeAg (2.5 kb prekor mRNA'dan), polimeraz protein (3.5 kb pgRNA'dan), viral zarf proteinleri, HBsAg (2.4 ve 2.1 kb RNA'lardan) ve HBxAg (0.7 kb RNA'dan) üretilir. Nükleokapsidi oluşturan HBcAg proteinleri farklı genotiplerde korunur. HBcAg genotipine göre 183 veya 185 aa içerir ve iki kısmı vardır. Genotipe göre birinci kısım kapsidin kendiliğinden bağlanması için yeterli olan 149 aa veya 151 aa'ya sahip bir N-terminali içerir. İkinci kısım 34 aa ile C-terminal protamin bölgesi olarak bilinir ve arginin bakımından zengin olduğu için pozitif yük sağlar. Protamin bölgesi pregenom/HBV polimeraz kompleksinin paketlenmesi için

gereklidir. PgRNA revers transkripsiyon ile yeni DNA genomlarının oluşması için kalıp görevi görür. Replikasyon pgRNA'nın kor protein ile kapsidasyonunu gerektirir. Bu prosedür viral polimeraz epsilon (ϵ) olarak adlandırılan ikincil steem-loop yapısının koordine edilmesiyle başlatılır ve viral nükleokapsid oluşumu için kapsidasyon başlatılır. HBV nükleokapsid oluşumu pgRNA, HBV polimeraz ve HBcAg dimerleriyle kompleksler oluşturduğu anda başlar. pgRNA paketlenmesi için kor proteinin C terminalinin fosforilasyonu gerekir. Olgun DNA içeren nükleokapsid olgunlaşmamış RNA içeren nükleokapsiden oluşurken fosforilasyon ve konformasyonel değişiklikler meydana gelir. HBV polimerazı pgRNA'nın epsilon bölgesine bağlanırken polimeraz negatif DNA zincirinin sentezi için protein primeri olarak işlev görür^{22,31}. pgRNA negatif DNA zincirinin sentezi için kalıp görevi gördüğünden yeni zincir uzar. Negatif DNA zincirinin sentezi tamamlandıktan sonra pgRNA kalıbı RNase H tarafından yıkıma uğrar. Tamamlanan negatif zincir pozitif zincir sentezi için kalıp olarak kullanılır. Pozitif zincir sentezi nadiren tamamlanır ve HBV viryonunda farklı uzunluklarda bulunur. Olgunlaşma adımı nükleokapsid içindeki RNA'nın DNA'ya dönüşmesi ile sitoplazmada tamamlanır. Her ne kadar HBV, RNA ara basamağı ile çoğalsa da konak genomuna entegrasyonu viral replikasyonunda HBV DNA için gerekli değildir. Ancak insan genomuna entegre HBV DNA HBV ile ilişkili HCC'li tüm vakalarda belirlenir^{17,28}. Olgun nükleokapsidin zarflanması ortamdaki viral yüzey proteinlerinin varlığına bağlıdır. Zarf proteinleri translayondan sonra endoplazmik retikulum zarına eklenir ve endoplazmik retikulumun lümenine tomurcuklanır. Hücre tarafından nükleokapsid içeren DNA zarfı kazanmışlarsa non-infeksiyöz subviral küresel ve filamentöz zarf partikülleri veya infeksiyöz Dane partikülleri olarak salınırlar. HBV tomurcuklanması ve salınımı intralüminal vezikülleri oluşturma özelliğine sahip olan multivesiküler gövde (Multivesicular Body; MVB) yolağının fonksiyonlarına bağlıdır. MVB'ler daha sonra intralüminal veziküllerin verilmesi için lizozom veya plazma zarı ile birleşir. MVB'lerin taşıma için gerekli olan endozomal sıralama kompleksleri (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport; ESCRT) Vps4 ATPase ve ilişkili proteinler için gerekli olan endozomal sıralama kompleksine bağlıdır. L protein sentezi sırasında pre-S1 bölgesi sitoplazma ile temas halindedir ve miristoillenmişlerdir. Bazı adımlarda pre-S aracılı nükleokapsidin zarflanmasından sonra zar boyunca translokasyon oluşabilir^{28,32,33}.

DNA içeren olgun nükleokapsid HBsAg proteinleri ile lipid membranı elde edildikten sonra enfeksiyöz Dane partikülü ER'un lumen kısmında birikirler, ardından golgi aygıtına doğru yolculuk başlar. Viral partiküller sekretuvar yolu kullanarak hücreden salınırlar. Non enfeksiyöz küresel ve tübüler subviral zarf partikülleri viryondan 10^3 - 10^6 kat daha yüksek kanda sentezlenir ve nükleokapsid içermezler²⁸.



Şekil 2. HBV'un replikasyonu

2.7. Patogenez

Kronik HBV enfeksiyonu etkili adaptif bir immün cevabın oluşmaması ve viral kalıcılığa sebep olması ile karakterizedir. Doğal ve adaptif immün cevaplar HBV'nin karaciğerden temizlenmesi için önemlidir. HBV sitopatik bir etki yapmaz. Böylece kronik HBV enfeksiyonu ile ilişkili karaciğer inflamasyonu ve fibrozu ağırlıklı olarak konak immün cevabı belirler.

HBV enfeksiyonunun ardından HBV DNA ve HBsAg serumda veya karaciğerde tespit edilebilir hale gelmeden önce 4-7 haftalık bir inkübasyon süresi vardır.

İnkübasyon dönemi boyunca gen dizisi çalışmaları güçlü bir interferon ile uyarılmış gen tepkisi ortaya çıkarmamış bu da HBV'nin başlangıçtaki doğal immun cevaptan kaçabilen gizli bir virus olabileceği önermesine yol açmıştır. Ayrıca doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücrelerini, NK T hücrelerinin ve makrofajların toplanmasının engellenmesi, Kupffer hücrelerinden sitokin sekresyonunu interferon- γ (IFN γ), tümör nekroz faktör (TNF), IL-6, IL-8 ve IL-1'in azaltılması ve hepatosit içinde retinoik aside uyarılabilir gen I protein ve Toll-like reseptör (Toll-like Receptor; TLR) sinyalinin bloke edilmesini içeren virus kaynaklı immun cevap da gelişmiştir³⁴⁻³⁶.

Akut HBV enfeksiyonunda viremi tespit edilebilir hale geldiğinde HBV DNA seviyesi serumda ml başına 10^8 - 10^9 viral kopyaların pik seviyelerine yükselir. Fakat daha sonra klinik hepatitin başlangıcından önce tipik olarak azalır. Periferel HBV'ye özgü CD4 + ve CD8 + T hücresi immun cevap HBV replikasyonunda hızlı bir şekilde artar. Karaciğerde HBV'nin sitolitik olmayan klirensi immün cevabın tespit edilebilir herhangi bir hücrel infiltrasyonu eksikliğinden yoksundur. Bu da virusa özgü CD8 + T hücrelerinden salgılanan IFN γ ve TNF yoluyla HBV replikasyonunun sitokin aracılı inhibisyonunu içerir. Enfekte hepatositlerin temizlenmesi ve daha fazla intrahepatik yayılmanın önlenmesi muhtemelen sitolitik ve sitolitik olmayan mekanizmaların bir kombinasyonunu gerektirir. Böylece akut HBV sırasında enfekte hücrelerin klirensine aracılık eden virusa özgü CD8 + T hücreleri enfeksiyonun ilerlemesini engelleyen ve HBsAg'ye karşı nötralize antikorlar salgılayan B hücreleri ile viral klirensi destekleyen CD4 + T hücreleri oluşur. Klinik iyileşme gösteren akut hepatit B genellikle kronik enfeksiyona yol açabilecek bağışıklık sisteminin olgunlaşmamasından dolayı enfeksiyon perinatal olarak ve çok erken çocukluk döneminde ortaya çıkmaz^{37,38}.

Persisten (kalıcı) kronik HBV enfeksiyonu temel olarak doğumda veya yaşamın ilk 2 yılında alınan enfeksiyonlarda ortaya çıkar. Persistenliği etkileyebilecek virolojik faktörler HBsAg'nin enfeksiyöz viriondan en az 1000 kat daha yüksek konsantrasyonlarda sentezini içerir. HBsAg içeren subviral partiküllerin aşırı üretimi HBV'ye özgü humoral bağışıklığı aldatıcı görev yapabilir ve virusa özgü T hücresi anerjisinin durumunu başlatabilir. Subviral partiküller ayrıca nükleer faktör- κ B (NF- κ B), mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK), normal olarak upregüle TLR sinyalleme ile inflamatuvar sitokinleri ve interferon ile uyarılmış gen transkripsiyonunu

baskılayan doğal immün sinyal yollarını negatif olarak uyarabilir. Çok fonksiyonlu HBx proteini viral proteinlerin proteazom bazlı bozulmasını önleyebilir, böylece HBV antijen sunumunu ve konak antiviral cevabı azaltabilir. HBx, HBV cccDNA'yı susturan SMC 5/6 gibi temel konak viral restriksiyon faktörlerini de bloke eder. Her iki mekanizma da viral persistenliğin oluşumuna veya korunmasına katkıda bulunur. HBV polimeraz proteininin ekspresyonu TLR sinyalleşmesi için çok önemli olan miyeloid farklılaşma primer yanıt proteini MYD88'in üretimini baskılar. Prekor veya HBeAg proteinleri HBeAg-pozitif hastalığı sırasında hepatositlerde TLR2 ekspresyonunu, hastaların Kupffer hücreleri ve periferik monositlerinde HBV'ye özgü sitotoksik T lenfositlerinde CD28 (CTL'ler) uyarıcı moleküllerini ve karaciğerde periferik kan monositleri ve Kupffer hücreleri üzerine CD86'ı downregüle ederek viral toleransı oluşturur. Son zamanlarda yapılan bir araştırmada doğal bağışıklık hücrelerinde ortak uyarıcı molekül OX40 ligandının (OX40L) ekspresyonunun HBV'nin fare enfeksiyonu modelinde klirensi için önemli olduğunu bildirilmiştir. OX40L'nin yaşa bağlı ekspresyonu kısmen çocuklarda yüksek kronik HBV oranı ile açıklanabilir^{34,39}.

HBV enfeksiyonunun immünolojik çalışmalarının çoğu periferik kanda yapılmaktadır. İmmün cevabın adaptif kısmında bulunan HBV'ye spesifik CD4 + ve CD8 + T hücre cevabı önemli ölçüde azalır. Kronik HBV enfeksiyonunda hem intrahepatik hem de periferik HBV'ye özgü T hücrelerinin sıklığı ve fonksiyonu dolaşımdaki HBV DNA seviyesi ile ters orantılıdır. Ayrıca bu baskılanmış T hücre cevabı virus ve viral antijenlerin yüksek seviyelerde uzun süreli varlığına bağlıdır. Bu nedenle HBV'ye özgü T hücrelerinin artan bir şekilde tükenmesine ve fonksiyon bozukluğuna yol açmasına sebep olur. Programlanmış hücre ölümü protein 1 (PD1) reseptörü olan CTL fonksiyonunu baskılamaktan sorumlu moleküllerin düzenlenmesi kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda HBV'ye spesifik CTL'lerde gösterilmiştir. Ayrıca sitotoksik T lenfosit antijeni 4 (CTLA4) de CD8 + T hücrelerinde upregüle edilir iken pozitif düzenleyici ligand CD40 ise CD4+ T hücrelerinde downregüle edilir. Bu değişiklikler sinyal molekülleri ile ilişkili T hücresi proliferasyonunun baskılanmasına ve immünosüpresif IL-10 üretiminin artmasına neden olur^{34,40}.

Son olarak humoral bağıklık ayrıca kronik HBV enfeksiyonunda da önemli bir rol oynayabilir. Bu, kronik HBV'li hastaların spesifik anti-B hücre tedavisi ile kanıtlanmıştır. Bu hastaların önemli bir kısmı viral reaktivasyon riskine sahiptir. Bu risk HBsAg seroklirens ve anti-HBs serokonversiyon oluşmuş hastalarda bile devam eder. Rituksimab sonrası reaktivasyon hızı T hücresi immünosupresif ajanları ile tedavi edilen benzer hastalarla karşılaştırıldığında HBV'nin kontrolü için B hücresi cevabının önemine işaret eder³⁴.

2.8. Klinik Seyir

2.8.1. Akut HBV Enfeksiyonu

HBV enfeksiyonunun klinik bulgularının spektrumu hem akut hem de kronik hastalıklarda değişir. Akut HBV enfeksiyonu sırasındaki HBV DNA seviyesi 6-10 hafta sonra pik yaptıktan düşmeye başlar. Aynı zamanda ALT (Alanin aminotransferaz) seviyesinin artmaması virusun karaciğerden temizlendiğini gösterir. Akut faz sırasında belirtiler subklinik veya anikterik hepatitten ikterik hepatite kadar değişir ve bazı durumlarda fulminan hepatit görülebilir. HBV kuluçka süresi 30-180 gün arasında değişmektedir. Akut HBV enfeksiyonu olan hastaların yaklaşık %70'inde subklinik veya anikterik hepatit bulunurken %30'unda ikterik hepatit görülür. Fulminan hepatit B hastaların yaklaşık %0.1-0.5'inde görülür. Fulminan hepatit enfekte hepatositlerin olgun immün aracılı lizis nedeniyle olabilir. Ani ateş, kusma, karın ağrısı ve sarılık ile başlar, bunu yön duygusunun kaybolması, bilinç bulanıklığı, algı bozukluğu ve koma izlemektedir. Prodromal dönemde serum hastalığı benzeri bir sendrom gelişebilir, bunu yapısal semptomlar, anoreksi, bulantı, sarılık ve sağ üst kadranda rahatsızlığı izleyebilir. Semptomlar ve sarılık genellikle 1-3 ay sonra kaybolur ancak bazı hastalar serum AST (Aspartat aminotransferaz) konsantrasyonlarının normalleştirilmesinden sonra bile uzun süreli yorgunluk yaşayabilir. HBV'nin yok edilmesi nadiren akut HBV enfeksiyonundan iyileşme sonrası meydana gelir. Gizli (occult) HBV enfeksiyonu klinik iyileşmenin ardından yıllarca T hücre cevabını sürdürebilir ve böylece virüsü kontrol altında tutabilir. İmmün sistemi etkili olan kişilerde akut HBV'dan kronik

HBV'a ilerleme oranı temel olarak enfeksiyonunun yaşı ile belirlenir. Bu oran perinatal yolla bulaşan bebeklerde yaklaşık %90, çocuklarda %25-30 ve yetişkinlerde %5'dir⁴¹.

2.8.2. Kronik HBV Enfeksiyonu

Kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların sadece küçük bir yüzdesinde akut hepatit öyküsü ortaya çıkar. Düşük veya orta sıklıktaki bölgelerde kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların yaklaşık %30-50'sinde geçmiş bir akut hepatit geçmişi vardır. Böyle bir öykü bu bölgelerde kalan hastalarda ve yüksek prevalanslı bölgelerde bulunan hastaların çoğunda yoktur. Kronik HBV'lu hastaların çoğu asemptomatiktir, diğerleri ise yorgunluk gibi spesifik olmayan semptomlara sahiptir. Bazı hastalar asemptomatik, akut hepatit veya hepatik yetmezlik gibi enfeksiyonun alevlenmelerini yaşarlar. Dekompanse sirozlu hastalarda sarılık, splenomegali, asit, periferik ödem, üst gastrointestinal kanama ve ensefalopati mevcut olabilir. Laboratuvar testleri normal olabilir, ancak çoğu hastada serum ALT ve AST seviyelerinde hafif ila orta derecede bir yükselme vardır. Alevlenmeler sırasında serum ALT konsantrasyonu normal üst limitinin 50 katı kadar yüksek olabilir ve 1000 ng/mL kadar yüksek AFP konsantrasyonları görülebilir. Dolaşımdaki immün komplekslerin aracılık ettiği düşünülen ekstrahepatik bulgular kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların %10-20'sinde meydana gelir. Kronik HBV'nin iki temel ekstrahepatik komplikasyonu poliartit nodoza ve glomerüler hastalıktır^{42,43}.

Kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyri virus replikasyonu ve konak immün cevabı arasındaki etkileşimle belirlenir. Cinsiyet, alkol tüketimi ve hepatit virusu ile birlikte enfeksiyon içeren diğer faktörler HBV ile ilişkili karaciğer hastalığının ilerlemesinde rol oynar. Kronik HBV enfeksiyonunun sonucu HBV replikasyonunun baskılandığı andaki karaciğer hastalığının ciddiyetine bağlıdır. Klinik olarak tüm hastalarda her aşama görülme de kronik HBV enfeksiyonu 4 faza ayrılır.

İmmün toleranslı faz viral replikasyonun olmasından dolayı yüksek titrelerde HBV DNA (>100.000 kopya/mL), HBeAg pozitifliği ve normal serum ALT seviyeleri ile karakterizedir. Karaciğer biyopsisinde çok az miktarda karaciğer nekroinflamasyonu veya fibrozu görülür. Bu faz özellikle perinatal olarak enfekte olmuş hastalarda nadiren

de erken çocukluk çağında ve yetişkinlerde görülür. İmmün tolerans fazı genellikle 10-30 yıl sürer. Buna karşılık erişkinlerde HBV spesifik T hücre fonksiyonundan dolayı immün tolerans dönemi genelde çok daha kısa ve diğer dönemlerden ayırt edilemeyecek kadar belirsiz olabilir. Ayrıca yüksek HBV DNA seviyesinden dolayı oldukça bulaşıcıdır⁴³.

İmmün tolerans fazdan immün klirens faza geçiş perinatal olarak edinilmiş HBV enfeksiyonu olan hastalarda ikinci ve üçüncü on yıl boyunca meydana gelir. İmmün klirens fazı sırasında spontan HBeAg klirensi yıllık %10-20 oranında artar. HBeAg serokonversiyonuna biyokimyasal alevlenmeler eşlik eder. HBV'a özgü sitotoksik T-hücresi aracılı immün cevap ve HBV ile enfekte olan hepatositlerin yok edilmesinin sonucu olarak AST seviyelerinde yükselmeler görülür. Alevlenmeler serum HBV DNA'sındaki artıştan ve HBeAg'nin hepatositler içindeki nükleerden sitoplazmik bölgelere geçmesi ile ortaya çıkar. İmmün klirensin viral yükteki bir artış veya viral antijenlerin oluşumundaki değişiklik ile olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu değişikliklerin nasıl gerçekleştiği bilinmemektedir. Çoğu alevlenme asemptomatiktir ve rutin takip sırasında farkedilir. Bununla birlikte, bazılarında akut hepatit semptomları eşlik eder ve daha önce kronik HBV enfeksiyonu olduğu bilinen hastalarda akut hepatit B'nin yanlış teşhisine neden olabilir. Alevlenmeler antiHBc-IgM titresindeki bir yükselme ve HCC'nin teşhisi ile ilgili endişelere yol açabilecek olan serum AFP konsantrasyonunda bir artış ile ilişkilendirilebilir. HBeAg'den anti-HBe'ye serokonversiyon, normal aminotransferaz seviyeleri ile birlikte çok düşük veya saptanamayan serum HBV seviyelerine yol açan virusun immün kontrolünün yanı sıra karaciğerde aktif inflamasyon ve fibroz ile karakterize olan immün temizleme fazının önemli bir klinik sonucudur. HBeAg serokonversiyonu siroz veya HCC gelişme riskinde azalma ile ilişkilidir^{42,43}.

İnaktif HBsAg taşıyıcı fazı, hastalık durumuna göre değişiklikler gösterir. Özellikle artan bir anti-HBe varlığına karşılık HBeAg ekspresyon kaybı vardır. HBsAg'den anti-HBs'ye kadar olan spontan serokonversiyon ve düşük saptanamayan serum HBV DNA seviyeleri de bu fazın özellikleridir. Ayrıca aminotransferaz seviyeleri sürekli olarak normal kalır. İmmün temizleme fazının uzunluğuna bağlı olarak düşük ile hafif hepatit ve fibroz görülebilir. Birçok hasta bu fazı birkaç yıl

sürdürür ve klinik sonucu genellikle iyidir. Kronik HBV enfeksiyonunun dalgalı doğası nedeniyle, hastalar 12 aylık bir gözlem süresi boyunca en az üç ALT seviyesi ve iki veya üç HBV DNA seviyesi olmadıkça aktif taşıyıcı olarak sınıflandırılmamalıdır^{42,43}.

Aktif karaciğer hastalığı durumu HBV'nin prekor veya bazal kor promotor bölgesinde mutasyonların varlığına bağlı olarak HBeAg negatifliği ile ilişkilidir. HBeAg negatif kronik HBV fazındaki hastalar daha yaşlı ve HBeAg pozitif hastalara göre daha yüksek fibrozis oranlarına sahiptir. Bu fazın bir özelliği de HBV DNA ve ALT anormalliklerinin dalgalı olmasıdır⁴².

HBsAg negatif faz serum negatif HBsAg ve HBcAg'ye karşı pozitif antikorlar (anti-HBc), HBsAg'ye saptanabilen antikorları(anti-HBs) olsun veya olmasın özelliği ile karakterizedir. Bu faz aynı zamanda 'gizli HBV enfeksiyonu' olarak da bilinir. Bu fazdaki hastalar normal ALT değerlerine sahiptir ve her zaman saptanamayan HBV DNA'sı vardır. HBV DNA karaciğerde sıkça tespit edilebilir. Siroz başlamadan önceki HBsAg kaybı, minimal siroz, dekompanseasyon ve HCC riski ve sağkalımda iyileşme ile ilişkilidir. Bununla birlikte eğer siroz HBsAg kaybından önce gelişmişse hastalar HCC riski altında kalır ve bu sebeple HCC gözetimi devam etmelidir⁴².

2.9. HBV ve Hepatosellüler Karsinoma (HCC)

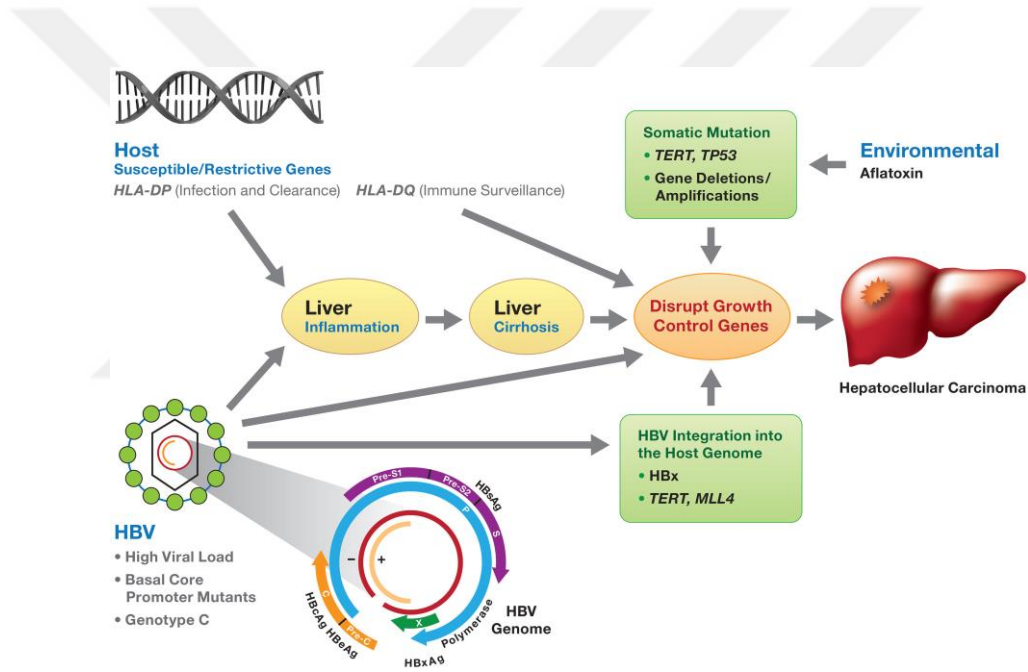
Tüm karaciğer kanserlerinin %80-90'ını oluşturan HCC dünya çapında en yaygın ve en ölümcül kanserlerden biridir. Dünyada karaciğer kanseri, 5 en yaygın kanser arasından ikinci ölüm sebebidir. Epidemiyolojik çalışmalar karaciğerde kronik HBV enfeksiyonunu HCC gelişimi için önemli risk faktörü olarak tanımlamıştır. Aşı olmasına rağmen dünya genelinde 350-500 milyon insan kronik olarak HBV ile enfekte olmaktadır ve yaş ve enfeksiyona bağlı olarak bu bireylerin %25'i HBV ile ilişkili HCC geliştirmeye devam etmektedir. Kronik HBV enfeksiyonunu HCC gelişimine bağlayan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış ancak HBV ile ilişkili HCC'nin genellikle on yıllık bir kronik HBV enfeksiyonu bağlamında gerçekleştiği göz önüne alındığında dikkat çekici olmuştur⁴³. Çalışmalar HBV ile ilişkili HCC gelişiminde hepatositlerin rejenerasyonu ve yıkım ile birlikte görülen kronik inflamasyon, HBV DNA entegrasyonunun konak genomuna sonuçları ve HBx gibi HBV proteinlerinin

potansiyel etkileri gibi üç ana faktör üzerinde odaklanmıştır⁴⁴. Yıllarca süren kronik bir HBV enfeksiyonunun önemli bir yönü HCC gelişiminden önce HBV ile ilişkili siroz gelişimini içerir. Genel olarak tüm HCC'lerin potansiyel olarak %70'i kadarının dekompanse siroz bağlamında gerçekleştiği ve kronik HBV enfeksiyonu ile siroz arasında güçlü bir ilişki olduğu kabul edilir. Son zamanlarda yapılan bir kohort çalışması kronik enfekte hastalar için HBV ile ilişkili siroz gelişme riskinin %41.5 olduğunu ve kümülatif olarak %21.7 oranında HCC gelişme riskinin olduğunu göstermiştir⁴⁵. Bu sebeple kronik hastalığın ara evreleriyle özellikle sirozun gelişmesiyle ilişkili hücresel mekanizmaların daha net bir şekilde anlaşılması HBV ile ilişkili HCC'nin sebeplerinin genel olarak anlaşılmasını arttırabilir. HBV enfeksiyonunun birçok yönü HCC gelişiminde rol oynar. Hepatosit fizyolojisini değiştiren HBV gibi hepatotropik virusların veya bunların çoğalmasının sonucu normal hepatosit ve genel karaciğer fonksiyonlarını bozabilmektedir. Bu bozulmaların ve değişikliklerin birçoğu ya viral replikasyonda veya HBx gibi viral proteinlerin aktiviteleri sayesinde HBV ile ilişkili HCC'nin gelişiminde rol oynar. HBV'un hücre döngüsünü bozduğunu, apoptotik yollarını, hepatosit metabolizmasını, miRNA ekspresyonunu ve miRNA aracılı regülasyonu değiştirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmaların çoğu Ras/mitojenle ilişkili protein kinazları (MAPK), rapamisinin mekanik hedefi (mTOR), PI3K/Akt ve NFκB içeren çoklu hücresel sinyal iletim yollarına odaklanmıştır^{43,46}. Bu yolların ve faktörlerin her biri HBV replikasyonu için önemli olsa da hepatosit fonksiyonlarının temel mediyatörüdür. Bu sebeple HBV ile ilişkili HCC'nin gelişmesi için potansiyel rollerinde ilgi yaratan hepatosit fizyolojisi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir⁴⁷.

HCC gelişme riski konak ve HBV ile ilişkili faktörlere göre değişir. Konak faktörleri arasında siroz, kronik hepatik nekroinflamasyon, yaşlılık, erkek cinsiyeti, Afrika kökenli, alkol kullanımı, diğer hepatit virusları ile birlikte koenfeksiyonlar veya HIV (Human immündeficiency virus), diyabet veya metabolik sendrom, aktif sigara kullanımı ve pozitif aile öyküsü sayılırken HBV ile ilişkili faktörler arasında yüksek HBV DNA ve HBsAg düzeyleri, HBV genotip ve spesifik mutasyonlar sayılabilir⁴³.

2.10. HBV ile İlişkili HCC'nin Moleküler Mekanizması

HBV ile ilişkili HCC'nin gelişimi için moleküler mekanizmaları (1) kronik inflamasyon ve hepatositlerin rejenerasyonu, (2) hücre büyümesi avantajı sağlayan genetik değişikliklerin birikmesi, (3) HBV DNA'nın konak genomuna entegrasyonu ve hücre çoğalmasını kontrol eden konak genlerin aktivasyonu, (4) genomik kararsızlık ve (5) virus proliferasyonunun viral proteinler özellikle HBx ile doğrudan etkisini içerir. HCC'nin gelişimi çevresel faktörlerin, HBV viral faktörlerin ve konak genetik duyarlı değişkenlerin ile birlikte hücre büyüme kontrolünü bozan somatik mutasyonların etkileşimi sonucudur⁴⁸ (Şekil 3).



Şekil 3. HBV ile ilişkili HCC'nin moleküler mekanizması

2.10.1. Konak Faktörleri

2.10.1.1. Konak Genetik Değişikliği

Her ne kadar HBV taşıyıcıları arasında HCC insidansı taşıyıcı olmayanlara göre çok daha yüksek olsa da kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların sadece bir kısmında HCC gelişir. Yapılan çalışmalar konak genetik faktörlerin HCC duyarlılığına katkıda

bulunduğunu göstermektedir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (Genome wide association studies; GWAS) HBV ile ilişkili HCC’de duyarlılık ve direnç lokuslarını tanımlamak için tarafsız bir yöntem sağlar. HCC ile ilişkili genetik duyarlılık lokuslarını güvenli bir şekilde belirleme yeteneği GWAS’ta küçük ile orta boyutlara sahip ilişkileri tespit etmek için örnek büyüklüğüne bağlıdır. Bunun sebebi yanlış pozitif sinyalleri artırma eğiliminde olan çoklu testler için düzeltme ihtiyacından kaynaklanmaktadır. HLA sınıf II bölgesindeki ilişkilerin en az iki çalışmada çoğaltıldığı bulunmuştur. Özellikle Doğu Asya’da yapılan bu çalışmalar orta ve yüksek penetran alellerin HCC gelişimine katkıda bulunmadığını düşündürmektedir.^{48,49}.

HLA-DQ proteinin alfa ve beta zincirinden kopyalan HLA-DQA1, HLA-DQA2 ve HLA-DQB1 yakınındaki intergenik tek nükleotid polimorfizmlerin (Single Nucleotide Polymorphisms; SNP) HCC ile ilişkisi GWAS tarafından iki büyük çalışmada tanımlanmıştır. HLA-DP, DQ ve DR proteinlerini içeren HLA sınıf II proteinleri HBV ve HCV de dahil olmak üzere yabancı patojenlere karşı antikor üretimine yol açan B hücrelerini uyaran CD4+ T hücrelerine hücre dışı antijen sunumunda merkezi bir rol oynar⁵⁰.

HLA bölgesi dışında birkaç gen için HBV’a bağlı HCC ile genetik ilişkiler bildirilmiştir. Doğu Asya’dan beş kohorttan oluşan iki aşamalı bir GWAS, KIF1B genindeki intronik rs17401966 SNP bir meta-analizde genom çapında öneme sahip olduğu tanımlanmıştır. KIF1B organellerin ve veziküllerin taşınmasında rol alan bir kinesin süper ailesi üyesini kodlar. KIF1B izoformunda hem germ hattı hem de somatik mutasyon fonksiyon kaybı birçok kanserde tespit edilmiştir. Ancak daha fazla validasyon ve fonksiyonel çalışmaların HCC’de KIF1b varyasyonunun rolü tartışmalı bir şekilde kalmıştır⁵¹.

GWAS’ın içerdiği diğer genler STAT4 ve GRIK1’dir. STAT4, Th1 hücrelerinin gelişmesinde ve antiviral ve antitümör aktiviteleri olan bir sitokin olan IFN-γ’nin üretilmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. STAT4 rs7574865 HCC dokularında dozaj etkisine sahip bir ekspresyon kantitatif lokusudur. Glutamat reseptörü GRIK1, HCC’deki fonksiyonel rolü deneysel olarak gösterilmemesine rağmen kanser gelişiminde rol oynar. Bu ilişki henüz tekrarlanmamış veya onaylanmamıştır. Son zamanlarda fonksiyonel bir genomik yaklaşım tümör baskılayıcı gen EPB41’i

düzenleyen ve HCC'ye yatkınlıkla ilişkili bir c-Myc bağlayıcı SNP'yi ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar tanımlanmış fenotipler ve replikasyon ile HCC'nin GWAS çalışmalarına daha fazla ihtiyaç duyulduğunu vurgulamıştır⁵².

2.10.2. Çevresel Faktörler

2.10.2.1. Somatik Mutasyon

Somatik mutasyonların çoğu rastgele meydana gelen ve tümör hücreleri için seçici bir avantaj sağlamayan tümör büyümesi sürecinde oluşan zararsız mutasyonlardır. Driver mutasyonları seçici büyüme avantajı sağlar ve normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümüne sebep olur. Tümör vakalarında tekrarlayan kodlama değişiklikleri olası kanser driver mutasyonlarını tanımlayabilir. Tümör ve tümör olmayan dokulardaki genom ve egzom dizilimi kanser türlerinde tümör gelişiminde somatik mutasyonların ve yapısal değişikliklerin önemini ortaya koymuştur ve kanserin hedef organlarından ziyade (BRAF V600E, KIT, EGFR ve ERBB2) moleküler değişikliklere veya genomik sınıflandırmaya dayanan daha etkili tedavi yöntemlerine yol açmıştır. HCC'deki tekrarlayan somatik mutasyonlar bilinen bazı kansere bağlı genlerde ve yolaklarda tanımlanmıştır. Bunlar telomer bakımı için gereken genleri, hücre çoğalmasını, hücre döngüsü düzenlemesini, epigenetik modifikasyonu düzenleyen Wnt sinyal yolunu, PI3K/Akt/mTOR, Ras/Raf/MAP, oksidatif stres ve JAK/STAT yollarını içerir. Kopya sayısı değişiklikleri bazı onkogenlerin kromozomal fokal amplifikasyonlarından ve daha az sıklıkla tümör baskılayıcıların homozigot delesyonlarından kaynaklanır. Tekrarlayan fokal amplifikasyonlar TERT ve MET'de görülürken tekrarlayan homozigot delesyonlar CDKN2A ve ARID1A diğerlerinde bildirilmiştir^{48,53}.

2.10.2.2. Tekrarlayan Somatik Mutasyonlar

TERT geni genomik bütünlüğü koruyan bir katalizör telomeraz alt ünitesini kodlar. TERT ekspresyonu somatik hücrelerde baskılanır, ancak kendini yenileyebilen dokulardaki proliferatif hücrelerde baskılanmaz. TERT promotöründeki somatik

mutasyonlar çoklu kanser tiplerinde bulunur. Kanser hücreleri ile ilişkili ölümsüzlük, telomerazın aşırı ekspresyonuna atfedilir. TERT promotör mutasyonları transkripsiyon faktörleri için potansiyel bir bağlanma bölgesi oluşturur ve artmış promotör aktivitesi ve TERT ekspresyonu artan telomeraz aktivitesi ile ilişkilidir. TERT promotör mutasyonları HCC’de gözlenen en sık rastlanan somatik genetik değişikliklerdir. Genel olarak yaklaşık %60’lık bir prevalansla %30-40 arasında HBV ile ilişkili HCC’lerde ve %60-80 arasında HCV ile ilişkili HCC’de görülür⁵⁴. HBV ile ilişkili HCC’de TERT promoter mutasyonlarının düşük oranı telomeraz transkripsiyonunu indükleyen mekanizmaya ek olarak görev yapan TERT promotörüne HBV DNA’nın eklenmesi ile kısmen açıklanabilir. TERT promotörü mutasyonları hepatokarsinogenezin adım adım gelişmesiyle ilişkili olarak düşük dereceli displastik nodüllerin %6’sında, yüksek dereceli displastik nodüllerin %19’unda, erken HCC’nin %61’inde ve küçük ve ilerlemiş HCC’nin %42’sinde tanımlanmıştır. TERT promotör mutasyonları sirozlu dokuda yüksek malign transformasyon riski için bir biomarker olarak kullanılabilir. TERT promotör mutasyonları genellikle küçük tümörlerde, düşük AFP serum seviyelerinde bulunanlarda daha sık görülmüştür. Bu sebeple TERT promotör mutasyonlarının tespiti düşük serum AFP seviyelerine sahip atipik veya erken HCC vakalarının tanısında yardımcı olabilir⁵⁵.

2.10.3. Viral Faktörler

2.10.3.1. Viral DNA Yüğü

Yüksek HBV replikasyonu kronik karaciğer hastalığı’ndan HCC’ye ilerlemesi ile ilişkilidir. Yapılan çalışmada virus titresi düşük olan kronik karaciğer hastalar arasında HCC gelişimi için yüksek risk gösterilmiştir⁵⁶. Diğer bir çalışmada serumdaki HBV DNA düzeyleri ($>10^5$ kopya/ml) ile taşıyıcılardaki karaciğer hastalığının histolojik derecesi veya evresi arasında bir ilişki olmadığı belirtilmiştir⁵⁷. Tayvan’da 3653 HBsAg pozitif olan büyük bir prospektif çalışmada ise HBV DNA seviyelerinin HCC insidansı ile pozitif korelasyon gösterdiği görülmüştür. HBV düzeyi 1 milyon kopya/mL’den daha yüksek olan bireylerde HCC gelişme olasılığı 300 kopya/mL’den düşük olanlara göre 10 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir⁵⁸. Ayrıca serum HBV DNA yükü HCC

tümörün rekürrensi ile ilişkilidir. Viral yükü 10.000 kopya/mL'den daha büyük olan ve karaciğer rezeksiyonu yapılan hastalarda bağımsız olarak HBV ile ilişkili HCC rekürrensi ile ilişkilendirilmiştir⁵⁹.

2.10.3.2. HBV Genotipi

HBV genotipleri farklı coğrafi bölgelere ve etnik topluluklara göre farklılık gösterir. HCC gelişme sıklığı HBV genotiplerine göre farklılık gösterir. Doğu Asya'da HBV genotip C, genotip B'ye kıyasla daha yüksek HCC gelişme riski ile ilişkilidir⁶⁰. HBV genotip C'li hastalarda serum HBV viral yükü genotip B ile enfekte olanlara göre önemli ölçüde daha çok görülmüştür⁶¹. HCC gelişme riskinin artması genotip C hastalarında yüksek HBV seviyelerine daha uzun süre maruz kalmanın sonucu olarak açıklanabilir⁶². Fakat bir çalışmada ise genotip B görülen genç hastalarda ve siroz olmayan hastalarda daha erken HCC geliştiği gösterilmiştir⁶³. Genotip C enfeksiyonunun hem retrospektif hem de vaka kontrollü çalışmalarda genotip B'den ziyade HCC de dahil olmak üzere daha ciddi karaciğer hastalığı formlarıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu bulgu genotip C'nin genotip B'den daha şiddetli karaciğer fibrozu ile ilişkili olduğunu 1.106 hastanın prospektif bir çalışmasında gösterilmiştir⁶⁴. Bu durum muhtemelen gecikmiş HBeAg serokonversiyonu, uzamış inflamasyon ve ilerlemiş fibroz veya siroz düzeyinde HCC gelişimi ile ilişkilidir. HBeAg ekspresyonu ile HBV DNA seviyesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu kabul edilmektedir. Bazı prospektif çalışmalar bazal serum HBV DNA seviyeleri arttıkça HCC gelişme riskinin arttığını da göstermiştir^{65,66}.

HBV genotipleri ile HCC arasındaki korelasyonu araştıran bir meta-analizde HCC tespiti genotip B için %12 ve genotip C için %25 oranı belirtilmiştir. Ayrıca genotip C hastaları ile daha ciddi karaciğer hastalıkları arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Ayrıca genotip A (%4) ve genotip C (%11) de benzer HCC gelişme sıklığına sahiptir⁶⁷. Hindistan'da Ghosh ve ark⁶⁸. HBeAg-negatif kronik HBV enfeksiyonu olan genotip D hastalarında ileri klinik evre ile mutasyon sıklığı arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu mutasyonların çoğu transkripsiyonu düzenleyen bölgelerde lokalize olmuştur. Bu sonuca göre pre-S bölgesindeki delesyon karaciğer

sirozunun en önemli sebebidir. Ayrıca klinik olarak önemli olan tek mutasyon ektopik bölgenin dışındaki HBV kor proteini C terminalinde S183P olarak tanımlanmış ve bu HBV genotip D'nin aktif olmayan bir taşıyıcı durumdan KHB ve karaciğer sirozunun ilerlemesine neden olmuştur. Bu sebeple yüksek riskli hastaların hastalığın ilerlemesinden önce viral genomik markerler kullanılarak tanımlanabileceği ve böylece karaciğer sirozu ve HCC insidansının azaldığı belirtilmiştir.

2.10.3.3. HBV Mutasyonu

HBV DNA replikasyonundan dolayı hızlı mutasyon geçirir ve HBV revers transkriptazın geri okuma fonksiyonu olmadığından dolayı diğer DNA viruslarına göre çok daha yüksek oranda meydana gelir Tahmini nükleotidlerin yer değişim oranı diğer DNA viruslarında daha yüksek fakat RNA viruslarından daha düşüktür⁶⁹.

2.10.3.3.1. Pre/S Bölgesi Mutasyonu

Pre-S mutasyonları özellikle pre-S1 ve pre-S2 delesyonu ve pre-S2 başlangıç kodon mutasyonları ER stresine, oksidatif DNA hasarına ve genomik kararsızlığa yol açan hepatositlerin ER'den anormal seviyede eksprese edilen zarf proteinlerin oluşumuna sebep olabilir. Bu sitotoksik etkiler karaciğer hücresi hasarına ve rejenerasyonuna neden olur. Pre-S bölgesinde oluşan C2964A, C3116T ve C7A mutasyonları HCC gelişme riskinin artması ile ilişkilidir. S genomik bölgesindeki stop kodon mutasyonların transkripsiyonel transaktivasyon aktivitesi ile kesilmiş proteinleri kodlayarak tümör gelişimini arttırdığı öne sürülmüştür. S genomik bölgesinde 172 veya 182 pozisyonundaki erken stop kodon mutasyonları karaciğer sirozu ve HCC oluşumunda yüksek risk taşımaktadır^{48,70}.

2.10.3.3.2. PreC/C Mutasyonu

Bazal kor promotör (BCP) mutasyonunu olan A1762T/G1764A HCC için risk faktörüdür. Toplam 1336 HCC vakasını içeren 15 prospektif çalışmanın meta-

analizinde çift mutasyonlu kişilerde HCC gelişme riskinin 3 kat daha yüksek olduğu görülmüştür⁷¹. BCP çift mutasyonunun varlığı anti-HBe serokonversiyonundan önce HBeAg üretimini ve viral yükü azaltır. Bununla birlikte HBeAg üretimini önleyen pre-C stop kodonu G1896A 600 HCC vakası ile yapılan yeni bir meta-analizde gösterildiği gibi HCC riskini etkilemiyor gibi görünmektedir⁴⁸.

2.10.3.3.3. Polimeraz Mutasyonu

Nükleoz(t)ide analogları (NA) HBV polimeraz/reverse transkriptaz inhibisyonu sayesinde HBV DNA seviyelerini azaltmada etkilidir. Bununla birlikte polimeraz/revers transkriptaz bölgesindeki direnç mutasyonlarının ortaya çıkması viral yaşamın hayatta kalma avantajı sağlarken NA tedavisinin başarısızlığına yol açar. Lamivudin dirençli KHB hastalarında yapılan bir çalışmada rtA181T/sW172X mutantının ortaya çıkması HCC riskini arttırmıştır⁷².

2.10.3.3.4. X Mutasyonu

HBx proteini büyüme kontrolünü sağlayan DNA onarımı ve epigenetik modifikasyonu içeren çeşitli konak hücresel genlerin transkripsiyonel bir aktivatörüdür. HBx hepatokarsinogenezde yer alan Ras/Raf/MAP kinaz yolunu aktive eder ve tümör baskılayıcı olarak görev yapan tümör proteini 53 geni (TP53) ile etkileşime girer. HBx genindeki belirli nokta mutasyonları özellikle K130M ve V131I çift yerdeğişimleri karaciğer sirozu ve HCC hastalarında kronik hepatit B hastalarına göre daha sık görülür. BCP'nin HBx ile kısmi örtüşmesi nedeniyle aynı nükleotid yerdeğişimleri hem HBx K130M ve V131I hemde BCP A1762T/G1764A değişiklikleri ile sonuçlanır. HBx mutasyonlarının artması HCC gelişmesi ile ilişkilidir. Çift xK130M+xV131I ve üçlü xK130M+xV131I+xV5M mutasyonları HCC riskini 4-5 kat arttırmıştır. Ayrıca 10, 30, 38, 88, 94 ve 144. bölgesindeki aminoasit yerdeğişimlerinin de HCC ile ilişkili olduğu bildirilmiştir^{48,73}.

2.10.3.4. HBV DNA Entegrasyonu

Konak genomuna HBV DNA entegrasyonu hepatokarsinogenezin önemli moleküler mekanizmalarından birisidir. HBV DNA entegrasyonu hem akut hem de kronik evrelerde meydana gelir. HCC dokularının %75-90'ında tespit edilebilir HBV DNA entegrasyonu doğrudan gen bozulmasına, konakçı genlerin HBV promotörlü transkripsiyonuna, viral konak transkript füzyonuna sebep olabilir ve proto-onkogenlerin aktivasyonuna veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açabilecek genom kararsızlığına neden olabilir. HBV entegrasyonundan kaynaklanan hücresel ve viral genlerin onkojenik aktivitesi hepatokarsinogeneze yol açan genetik eksikliği olan hücrelere seçici bir büyüme avantajı sağlar. Gelişmiş genom sekans teknolojisi HCC'lerde HBV entegrasyon bölgelerinin taraflı olmayan genom taramalarına olanak sağlamıştır⁷⁴. HBV entegrasyon bölgeleri bütün genomda rastgele dağıtılır. Kanserle bağlı birçok gende tekrarlayan HBV entegrasyon bölgeleri tespit edilir. En yüksek HBV entegrasyonu frekansı TERT geninde tespit edilir. TERT'deki entegrasyon TERT gen ekspresyonu ile ilişkilidir. TERT geninin yeniden aktivasyonu muhtemelen kronik HBV enfeksiyonu sırasında erken klonal avantaj sağlar. Bütün genom sekansı HCC tümörlerinde TERT lokusunda HBV entegrasyonunun klonal genişlemesini tanımlayarak karaciğer kanserogenezindeki rolünü ortaya koymuştur. MLL4 ve CCNE1 dahil olmak üzere HCC karaciğer dokusunda HBV entegrasyonu için yaygın olarak tanımlanmış tekrarlayan hedef genler bulunur⁷⁴. Çok sayıda entegrasyon bölgesi olan kişilerde HCC'nin sağkalımı olumsuzdur. Entegre HBV genomunun kendisi onkogenik olabilir. Entegrasyondan sonra HBx'in 3' ucu sıklıkla çıkartılır, bu da HCC'nin başlatılmasına ve ilerlemesine katkıda bulunan C-terminali ile kesilmiş HBx proteinine yol açar. Kesilmiş HBx proteininin hepatositlerin transformasyon yeteneğine katkıda bulunduğu ayrıca hepatoma hücre invazyonu ve metastazı arttırdığı gibi, hücresel proliferasyonu arttırmak için C-Jun/MMP10 aktivasyonunu indüklediği bildirilmiştir⁷⁵. Kesilmiş HBx çeşitli çalışmalarda tümör olmayan dokularla karşılaştırıldığında tümörlerde anlamlı olarak daha fazla bulunur ve HCC dokusunda kesilmiş HBx ekspresyonu hastanın sağkalımının azalması ile ilişkilidir. HBV entegrasyon bölgelerinin kantitasyonu HCC sağkalımını öngörmede prognostik değere sahip olabilir.

2.10.3.5. HBx Proteini

HBx yaklaşık 17 kDa'lık bir moleküler kütleye sahip yüksek oranda korunmuş 154 amino asit'lik bir proteindir. HBx hem gen hem de protein için verilen addır. Çünkü amino asit dizisi bilinen herhangi bir proteine homolog değildir. Çoğunlukla sitoplazmada ve daha az oranda hepatosit çekirdeğinde lokalize olur. HBV DNA konak genomuna entegre edilebildiğinden HBx geni HBV replikasyonu olmasa bile insan HCC hücrelerinde muhafaza edilebilir ve kopyalanabilir. HBx hücrel transkripsiyonu protein yıkımını ve hücrel proliferasyon ve apoptozu düzenler. HBx doğrudan DNA'ya bağlanma yerine protein-protein etkileşimleriyle hücrel promotörler üzerinde etki eder.

HBx'in epigenetik moleküllerin (miRNA'lar ve lncRNA'lar) ve çeşitli genlerin serbest bırakılmasına yol açan olayların (Metilasyon ve Asetilasyon) ekspresyonunu ve aktivitelerini değiştirdiği bildirilmiştir⁷⁶.

2.10.3.5.1. Transkripsiyonel Transaktivatör

HBx proteini güçlü bir transaktivatör olarak görev yaptığı çeşitli viral ve hücrel promotörleri etkileyebileceği görülmüştür. Transkripsiyonel aktiviteyi temel olarak doğrudan protein-protein etkileşimi yoluyla düzenler. HBx'in fonksiyonu bulunduğu bölgeye göre değişir. Sitoplazmik HBx hücre içi sinyal iletimini kademeli olarak değiştirir ve nükleer HBx ise doğrudan transkripsiyon faktörlerini engelleyebilir veya transkripsiyon faktörüne benzer bir fonksiyon gösterebilir. Bu sebeple HBx sitoplazmada MAPK/ERK yolu gibi sinyal iletim yollarını uyarır. Aynı zamanda c-Myc ve c-Jun gibi proto-onkogenlerin ekspresyonunu, NF-κB, AP-1, AP-2 ve RNA polimeraz II'nin RPB5 alt birimini, TATA bağlayıcı protein ve ATF/cAMP cevap elemanı bağlayıcı protein (CREB) gibi transkripsiyonel faktörlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyonel transaktivatör olarak görev yapar⁷⁷.

HBx ile doğrudan etkileşime giren TNF-α sinyalinde Smad4 ve nükleer faktör aktif T hücreleri, fosfonenol piruvat karboksikaz ekspresyonunda COX-2,46 ve retinoid X reseptörü gibi daha fazla hedef protein tanımlanmıştır⁷⁸. Ayrıca IL-6 ve IL-

8'in regülasyonu, nitrik oksit sentetazın indüksiyonu ve Fas ligandı gibi konak genleri dolaylı olarak HBx'den etkilenmektedir. NF- κ B ve AP-1'in HBx'den doğrudan veya dolaylı olarak etkilendiği bildirilmektedir. HBx tarafından NF- κ B aktivasyonu p105 öncüsü gibi inhibitör proteinlerle doğrudan etkileşime girer. Ayrıca HBx NF- κ B ve AP-1'e transkripsiyonuna bağlı sinyal yollarını düzenlemek için MAPK/ERK, stresle aktive olan protein kinaz (SAPK)/c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve protein kinaz C (PKC) bileşenlerini aktif eder. Mekanizma ne olursa olsun HBx kaynaklı NF- κ B ve AP-1 aktivitesi hücre döngüsü ilerlemesini hızlandırır, proliferasyonu artırır ve apoptozu baskılayabilir⁷⁷.

2.10.3.5.2. Sinyal Yolları

Sinyal yolları yaygın olarak karsinogenez ile ilgilidir. Önemli bir onkoprotein olan HBx HCC gelişimi sırasında birçok sinyal yolu ile etkileşime girer. Önceki çalışmalar farklı yollardaki HBx ekspresyonu ile ilişkili temel moleküller üzerine odaklanmış, araştırmadaki ilerlemelerle birlikte bu ifade değişikliklerinin arkasındaki mekanizmalar daha da aydınlatılmıştır. Notch sinyal yolu evrimde büyük ölçüde korunur ve hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve apoptozu etkiler. Çalışmalarda HBx'in hepatokarsinogenezi indüklemek için Notch yolunu aktif edebileceği gösterilmiştir. Ancak Notch1'den Notch4'e dahil dört transmembran reseptöründen hangisinin olduğu belirtmemiştir. Bir çalışmada γ -sekretaz inhibitörünün HBx ile enfekte olmuş hücrelerde sahip olduğu etkiyi gözlemleyerek HBx ve Notch yolu arasındaki bağlantıyı kurmayı amaçlamıştır. Bununla birlikte Notch yolundaki dört reseptörün tümü bloke edilmiş, bu sebeple hangi reseptörlerin HBx ile etkileşime girdiği belli olmamıştır. HepG2X hücrelerinde HBx'in hem Notch1 hem de Notch 4'ün ekspresyonu upregüle olarak bulunmuştur⁷⁹.

PI3K/mTOR yolu ayrıca hepatokarsinogenezde hayati önem taşır. Bu yolun aktivasyonu Ras, Scr ve CXCR4 ekspresyonunu upregüle düzenleyerek kanser hücrelerinin ilerlemesini, invazyonu ve metastazı teşvik eder. Son çalışmalarda upregüle edilmiş AFP, fosfataz ve tensin homologuna (PTEN) bağlanabildiğini ve PI3K/mTOR yolağı üzerindeki inhibisyonunu zayıflatabildiğini ortaya koymuştur. Bu

upregölasyonun HBx tarafından indüklediği gösterilmiřtir⁷⁹. Salgılanmış kıvrıklıkla ilişkili proteinler (Secreted Frizzled Related Protein 1; SFRP'ler) Wnt ligandlarına bağlanabilen ve hücre çoğalması, farklılaşması ve metastazı içeren bir yol olan Wnt /- katenin sinyal yolunu antagonize eden hücre dışı glikoprotein ailesidir. HBx tarafından indüklenen hepatom hücrelerinde SFRP1 ve SFRP5 ekspresyonundaki azalma promotörlerine DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) ve DNMT3'ün alınması ve daha sonra hipermetilasyon ile ilişkilidir. SFRP'lerin bu ekspresyonu Wnt yolu üzerindeki antagonistik etkiyi azaltarak epitelyal mezenkimal geçişe (EMT) sebep olur ve hepatokarsinogeneze katkıda bulunur⁷⁹.

Kompleks sinyal yollarında büyük ölçüde büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar aracılık eder. Bu faktörler hücre proliferasyonunu artırabilir veya inhibe edebilir. Ayrıca uygun hedef hücrelerde bir dizi farklılaştırılmış cevabı indükleyebilir. Bir büyüme faktörünün reseptörü ile onun spesifik bağlanma etkileşimi hücre içi biyokimyasal olayları aktif eder. Biyokimyasal sinyallerin nükleusa transformasyonu mitojenik cevapda rol alan genlerin ekspresyonunu etkiler. Bu sebeple sinyal transdüksiyon yolunun bir bileşeninin inhibisyonu hücrede başka bir yolun düzenlenmesi ile telafi edilebilir. Bu yollar kanserde sıklıkla uygun olmayan şekilde aktif edilir. Sinyal iletim yollarının bozulmasının insan kanserinde yaygın bir olay olduğu ve terapötik müdahale için bir hedef sağladığı görölür. Benzer şekilde hepatositlerdeki sinyal iletim çoğalma, farklılaşma veya ölüm gibi sinyallere dönüştürür. Ayrıca enfekte olan hepatositler genellikle siroz ve HCC'ye ilerleyen bir süreçte hem virusun hem de hücrenin simbiyotik hayatta kalmasını maksimize etmek için büyüme ve hücre ölümüne yol ačan sinyal iletim yolaklarını düzenler⁸⁰.

2.10.3.5.3. DNA Hasarı

DNA hasarı HCC karsinogenezini başlatan kilit mekanizmalardan birisidir. HBx DNA onarım yolunun integral bir bileşeni olan 10 polipeptidin çoklu protein kompleksi olan transkripsiyon faktörü IIH (TFIIH) etkileşimi ile HCC kanserogenezini başlatmak için DNA onarımını engelleyebilir. HBx ultraviyole duyarlılığını artıran ve DNA tamir kapasitesini azaltmasını sağlayan TFIIH'ın fonksiyonunu engeller. HBx proteininin

yapısı ile baz eksizyon onarımı (Base Excision Repair; BER) yolundaki kilit bir enzim olan insan timin DNA glikosilazının (TDG) merkezi alanı arasında çarpıcı bir benzerlik vardır. Bu benzerlik HBx'in BER yolunu inhibe etmesini sağlar. İnsan 8 oksoguanin DNA glikosilaz 1 (hOGG1) ve DNA glikosilaz oksidatif DNA hasarında görevli iki DNA onarım enzimidir. HBx ile enfekte olmuş hücrelerde transkripsiyon seviyesinde hem hOGG1'in hem de DNA glikosilazın hafif bir azalması ve bir mRNA seviyesinde DNA glikosilazın önemli bir azalması HBx'in karaciğer hücrelerinde DNA onarım işlemini engelleyebileceğini göstermektedir^{76,81}.

2.10.3.5.4. Oksidatif Stres

Hücre içi redoks durumu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşması fonksiyon bozukluğu, mutasyonlar ve toksisite dahil olmak üzere bir dizi hücre hasarına neden olabilir. NAD(P)H kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1), dopamin türevi kinon molekülleri ve ROS detoksifikasyonuna katılan bir faz II enzimidir. HBx NQO1'in transkripsiyonel regülasyonu ile mitokondriyal hasara ve oksidatif strese sebep olabilir. HBx kaynaklı ROS ayrıca, mitokondriyal DNA'da mutasyon ve karsinogenezi ortaya çıkardığı düşünülen nükleus DNA'sından daha şiddetli DNA hasarına neden olabilir. Bu etki HBx'in C terminalinin kesilmesiyle ilgilidir. Bunun aksine HBx'in ayrıca, piruvat dehidrojenaz kinaz 4'ün ve Mn süperoksit dismutazın (SOD) bir aktivatörü olan Forkhead kutusu sınıfı O4'ün (Foxo4) upregülasyonu yoluyla anti-oksidatif stres fonksiyonlarını yerine getirdiği rapor edilmiştir⁸².

2.10.3.5.5. İmmün Sistem

Hücrel doğal bağışıklıktan virusun kaçması enfekte hepatositlerde HBV'nin hayatta kalması için koruyucu bir faktördür. Toll like reseptör 3 (TLR3) doğal bağışıklıkta önemli bir hedef tanıma reseptörü (PRR) iken TIR-bölgesi içeren adaptör interferon (TRIF) onun uyarıcısıdır. HBx, TRIF ekspresyonunu proteazom bağımlı bir şekilde azaltarak TLR3 sinyal yolunu zayıflatabilir. Bu, HBV replikasyonuna katkıda bulunur ve virusun doğuştan gelen bağışıklıktan kurtulmasını sağlar. Erken HBV

enfeksiyonunda doğal immün aktivasyon göstergesi olan IFN- β aktivasyonu yoktur. Interferon promotör stimülatörü 1 (IPS-1) IFN- β üretimi için gereken kinazı alabilen başka bir PRR adaptörüdür. HBx IPS-1'e bağlanarak IFN- β sinyalini azaltır. Bu, HBV'nin bağışıklık sisteminden kaçması için başka bir yoldur. Akut enfeksiyonda veya karaciğer hastalığının erken evrelerinde HBV'ye özgü sitotoksik T lenfositleri (CTL'ler) HBV'ü ortadan kaldırabilir. T hücreleri, prekürsör B hücreleri, monositler ve nötrofiller gibi kemokin çekici immün hücrelerin oluşumu karaciğere zarar verdiği gösterilmiştir. Bu tür kemokin endoplazmik retikulum stres yoluyla HBx tarafından indüklenen stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF-1)'dir. Karaciğerde bulunan bağışıklık hücreleri daha ciddi bir kronik hepatit tablosu ile ortaya çıkarır^{76,83}.

2.10.3.5.6. Apoptoz

HBx apoptozu farklı şekillerde etkileyerek HCC'nin ilerlemesine katkıda bulunur. HBx'in apoptoz üzerinde ya inhibe ettiği ya da etkisinin olmadığı gösterilmiştir. HBx miktarının artması apoptozu desteklediği ve düşük seviyelerinde engellediği bildirilmiştir. Anti-apoptotik özelliğinin örneklerinden biri, sitoplazmada p53'ün kompleks oluşumunu ve ayrılmasını içerir. Sonuç olarak, p53 apoptotik yolda gerekli olan ve böylece hücre sağkalımının artmasına neden olan Bax, p21 veya Fas gibi efektör moleküllerini upregüle olarak düzenleyemez. HBx fosfatidil inositol-3 kinaz ve AKt yolunun indüksiyonu sayesinde H-ras onkojeni ile ilişkili kaspaz 3 fonksiyonunu inhibe ederek HBx-P3KAkt-Bad yolu sayesinde p53 kaynaklı apoptozu önler. Anti-apoptotik proteinin konsantrasyonundaki artış bu kategorideki p38/MAPK yolu ile etki yapan başka bir örnektir⁸⁴. HCC'de yüksek oranda eksprese edilen ve p53'ün karşısındaki HBx'in etkilerine aracılık eden bir başka molekül siklooksijenaz-2 (COX-2)'dir. COX-2/PGE2 yolunun aktivasyonu HBx ekspresyonu tarafından elimine edilen p53 kaynaklı apoptozun ortadan kaldırılmasına yol açar. Buna karşılık HBx'in doğrudan sitoplazmik sitokrom c, kaspaz-3 benzeri aktivite ve nükleer parçalanmayı indükleyerek apoptoza sebep olduğu HeLa, Hep3B ve HepG2 hücre kültüründe gösterilmiştir^{85,86}.

TNF- α ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) tümör nekroz faktörü süper ailesinin bir üyesidir. TRAIL'in görevi temel olarak tümör hücrelerinde hücre

apoptozisini indüklemektir. HBx, iki ölüm reseptöründen biri olan TRAIL-R2 (DR5) ekspresyonunu indükleyebilir ve TRAIL kaynaklı apoptozu teşvik edebilir. Bununla birlikte, NF- β yolu ayrıca DR5'in upregülasyonundan da sorumludur. A20 kaspaz-8 çoğalmasını düzenleyen ve aktivitesini inhibe edebilen E3 ubiquitin ligazıdır. Kaspaz-8a TRAIL sinyal mediyatörü olarak bilinir. HBx A20'nin ekspresyonunu inhibe ederek kaspaz-8'in inhibisyonunu azaltır ve böylece hepatositleri TRAIL kaynaklı apoptoza duyarlı hale getirir⁸⁶.

B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ve miyeloid hücre lösemi-1 (Mcl-1) iki apoptoz inhibisyon genidir. HBx'in Bcl-2 ve Mcl-1 ekspresyonunu arttırdığı ve hepatik progenitör hücrelerde karşılık gelen Bcl-2 ile ilişkili X proteinini (Bax) düşürdüğü bulunmuştur. Kaspaz-9 ve kaspaz-3'te bir düşüş ve β -kateninde bir artış gözlenmiştir. Bu, HBx'in hepatik progenitör hücrelerde apoptozu inhibe ettiğini gösterir. Tüm etkileri göz önüne alındığında HBx hem apoptoz hem de anti apoptoz fonksiyonuna sahiptir⁸⁷.

2.10.3.5.7. Epigenetik

Son zamanlarda, HBx tarafından başlatılan epigenetik mekanizmaların HBV aracılı HCC'de yer aldığı gösterilmiştir ve daha da önemlisi, bu çalışmalar ayrıca bu epigenetik mekanizmaların virus biyosentezinde bir rolü olduğuna dair kanıt sağlamıştır. DNA metilasyonu, histon asetilasyonu ve kodlayıcı olmayan RNA (ncRNA) ekspresyonunu içeren epigenetik değişiklikler son yıllarda yoğun bir şekilde incelenmiştir. Bu değişiklikler kodlama ve kodlamayan gen ekspresyonunu etkileyebilir. Epigenetik değişiklikler patojenler, kimyasallar, UV ışığı gibi birçok faktör tarafından tetiklenebilir. HBV'nin indüklediği HCC'de HBx en önemli faktör olarak kabul edilir⁷⁶.

2.10.3.5.8. Kodlanmayan (Non-Coding) RNA'lar

Genomdan kopyalanan RNA'ların hepsi kodlayıcı RNA'lar değildir. Son RNA sekans verileri, insan genomunun %90'ından fazlasının ncRNA'lara kopyalandığını göstermiştir. miRNA'lar ve uzun kodlayıcı olmayan RNA'lar (Long non-coding RNAs;

lncRNA'lar) ncRNA ailesinin iki önemli üyesidir ve fonksiyonlarını transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyelere uygularlar. Her ikisi de insan kanserinde çok önemli bir rol oynamaktadır⁸⁸.

2.10.3.5.9. HBx Gen Mutasyonu

HCC hastalarında HBV genomu, tümör ile komşu tümör dışı dokular arasında farklılık gösteren ve ayrıca amino asit yerdeğişimi ile sonuçlanan nükleotid mutasyonları gibi duplikasyon, delesyon ve inversiyon dahil olmak üzere önemli yapısal değişiklikler ile yüksek oranda mutasyona uğrar. HBx geninde konservatif olmayan yerdeğişimler gözlenmiş bu mutasyonların HBx proteininin yapısını değiştirebileceğini, dolayısıyla tümörijenik potansiyeli etkilediğini veya HBx proteininin konak immün sürveyansından kaçışını kolaylaştıracağını düşündürmüştür. Kesilmiş HBx proteinleri de yaygın olarak gözlenmiştir. İnsanlarda 50 HCC tümör dokusu numunesinin incelenmesi, 23'ünde (%46) C-terminali kesilmesinin olduğunu göstermektedir. Kesilmiş HBx proteininin ekspresyonu matris metaloproteinaz 10'u (MMP10) aktive ederek HepG2 hücrelerinin invazyon yeteneğini artırır⁸⁹. Bu kesilme in vitro ve in vivo olarak daha hızlı proliferasyona ve daha düşük apoptotik frekansa yol açar. Kesilmenin derecesi de önemlidir. Bir çalışmada C terminalinin 14 ve 23 amino asit kesilmesinin HBx seviyelerini düşüreceğini göstermektedir. NF- β aktivitesi ve HBV replikasyonu HepG2 hücrelerinde de tam uzunluktaki HBx'den çok daha düşüktür. C-terminali, HBx'in subselüler yerleşimi için hayati öneme sahiptir. C-terminalinin 44 (111-154) amino asitleri mitokondriyal hedefleme için yeterlidir. Kesilme durumunda, 7 amino asit (111-117) HBx için mitokondriyal hedefleme sekansı (MTS) yeterlidir. Kemoterapiden sonra kalan kanser kök hücrelerinin tümörün yeniden nüksetme sebebi olduğu düşünülmektedir. Kanser kök hücreleri'nin alt tipi olan pozitif CD133 tümörü başlatabilir ve kemoterapiye direnç gösterebilir⁷⁶.

HBx geni içindeki A10R-S144R çift nokta mutasyonu merkezi ve para-tümör izolatları arasında bulunmuştur. Bu mutasyon hücre döngüsünü durdurur ve wild tip HBx'e kıyasla daha düşük bir p53 bağlama yeteneğine sahiptir, bu da p53'e bağlı apoptozu azaltır. Buna karşılık K130M/V131I mutasyonu HBx'in p53 bağlama

yeteneğini artırabilir. Bu ikili mutasyon çeşitli insan tümörlerinde artan hipoksi-indüklenebilir faktör-1'in (HIF-1) transkripsiyonel aktivitesini güçlendirir. Bu ikili mutasyonun getirdiği daha güçlü bir ikincil yapının hipoksi-indüklenebilir faktör-1a ile etkileşimin arkasındaki mekanizma olduğu düşünülmektedir⁹⁰.

2.11. miRNA Tarihçe

miRNA'ların tarihi mikroskobik solucanlar üzerindeki temel araştırmalarla başlamıştır. Sydney Brenner 1970'lerin ortalarında *Caenorhabditis elegans*'da sinirsel gelişmeyi incelerken mutant solucanların taranması sırasında lin-4 (hücre soyadı anormal) olarak adlandırılan gelişimsel zamanlama defekti (heterokronik mutant) olan ilk nematodu izole etmiştir. Bu özel keşif insan biyolojisi ve hastalıkları için önemli etkiye sahip kavrama yol açmıştır. Brenner laboratuvarında 1980'lerin başında John Sulston ile birlikte doktora sonrası araştırma görevlisi olarak çalışan Robert Horvitz, ilham verici arayış sırasında hayvanlarda zamansal gelişim modelinin nasıl kontrol edildiğini anlamak için lin-4'ü tanımlamıştır^{91,92}. Anormal soyun, heterokronik gen lin-4'teki boş bir mutasyonun (e912) bir sonucu olduğu tespit edilmiştir. Lin-4 (e912) mutasyonunu taşıyan solucanlarda anormal bir yetişkin fenotipi geliştiği için solucanlar geç larva döneminde gelişimini tamamlayamaz ve yumurtlayamazlar. Larva gelişiminde L1'den L2'ye geçiş için Lin-4 aktivitesi gereklidir. Horvitz laboratuvarında 1984'de doktora sonrası bir araştırmacı olan Victor Ambros, *C. elegans*'ın heterokronik mutantlarını karakterize etmek için çalışırken boş lin-14 mutantlarında başka bir heterokronik mutant soyunu bulmuştur⁹³. Daha sonra 1987'de Edwin Ferguson ve Paul Sternberg lin-14 genindeki baskılayıcı mutasyonların lin-4 fonksiyon kaybında görülen fenotipin tersine çevirdiğini bildirmiştir^{94,95}. Bu ilginç gözlemler lin-4'ün lin-14'ü negatif olarak düzenlediği epistatik bir etkileşime işaret ettiğini göstermiştir. Lin-4'ün gen ürününün ilk varsayımı lin-14'ün negatif regülatörü olarak görev yapan bir protein olduğu ancak bunun sonraki yıllarda yanlış olduğu ispatlanmıştır. Ambros 1989 yılında lin-14 genini klonlamak için Ruvkun ile çalışmış, Ambros lin-4 genine ve Ruvkun lin-14 genine odaklanmıştır⁹⁶.

Ambros ile birlikte Rosalind Lee ve Rhonda Feinbaum, lin-4 geni içeren 700-bp uzunluğunda bir fragment bulmuşlar ancak konvansiyonel başlama ve durdurma

kodonlarını bulamamışlardır. Buna rağmen varsayılan açık okuma çerçevesine mutasyonlar yerleştirmesine rağmen lin-4 fonksiyonu değişmeden kalmıştır. Bu nedenle Ambros lin-4'ün bir proteini kodlamadığı sonucuna varmıştır. Ayrıca 22 nt ve 61 nt uzunluğunda kodlanmayan iki küçük lin-4 transkriptini tanımlamıştır. Öte yandan Ruvkun, Bruce Wightman ve Ilho Ha ile birlikte lin-4 küçük RNA'lara sekans tamamlayıcılık gösteren lin-14'ün 31 çevrilmemiş bölgesinde (UTR) yedi element tanımlamıştır. Bu iki bağımsız çalışma lin-4'ün, bir antisens RNA dubleks etkileşimi yoluyla bir post-transkripsiyonel mekanizma ile lin-14 üzerindeki etkilerine aracılık ettiği yeni bir mekanizma keşfetmiştir. Heterokronik *C. elegans* mutantlarının tanımlanmasıyla başlayan bu çalışma kodlamayan bir RNA'nın aracılık ettiği yeni bir düzenleyici mekanizma türünün keşfedilmesine yol açmıştır⁹⁴.

Let-7 *C. elegans*'ın heterokronik bir genidir ve 2000 yılında ilk miRNA'nın bulunmasından yedi yıl sonra keşfedilen ikinci miRNA'dır. Reinhart ve arkadaşları let-7'nin larva gelişiminin L4'ten yetişkinlere geçişini kontrol eden 21 nt uzunluğunda RNA olduğunu bildirmiştir⁹⁷. Let-7 aktivitesinin kaybedilmesi gelişiminin erişkin aşamasında larval hücre kaderlerinin tekrar ortaya çıkmasına sebep olurken let-7 aktivitesinin artması yetişkin kaderlerinin erken yaşta ekspresyonuna neden olmuştur. Frank Slack ve arkadaşları, geç larva safhaları sırasında let-7 aktivasyonunun yetişkin tanımlamasını kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olan LIN-29'u olumsuz yönde düzenleyen LIN-41 hedefini downregüle ederek nematod larva-yetişkin geçişini düzenlediğini keşfetmiştir⁹⁸. Birkaç ay sonra Amy Pasquinelli ve arkadaşları insanlar ve diğer model organizmalar da dahil olmak üzere birçok hayvan türünde let-7 RNA homologları tanımladıklarını bildirmiştir⁹⁹. İnsanlarda beyin, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, trakea, kolon, ince bağırsak, dalak, mide ve timus gibi dokuların çoğunda let-7'nin farklı ekspresyon seviyeleri saptanmıştır. Ayrıca let-7'nin aracılık ettiği gelişimsel düzenlemenin *Drosophila* ve Zebra balığı dahil olmak üzere diğer türler arasında korunduğu, bu da kodlamayan küçük RNA let-7'nin aracılık ettiği mekanizmanın evrim yoluyla korunduğunu ortaya koymuştur¹⁰⁰.

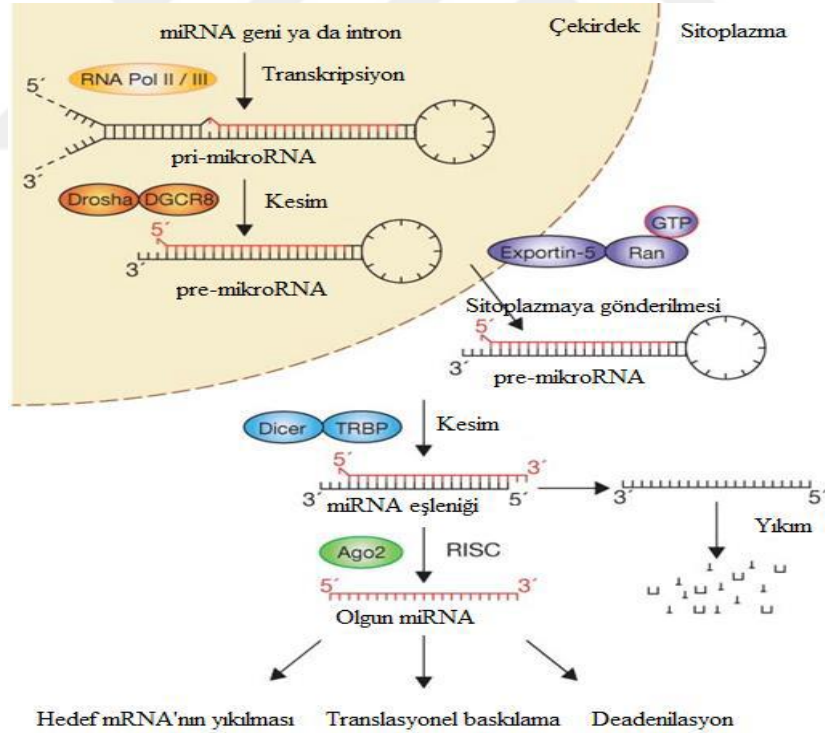
2.12. miRNA'ların Biyogenezi

İnsan genomunun yaklaşık %1.5'i toplamda 20.000-25.000 geninin protein kodlayabildiği bildirilmiştir. miRNA'lar intronik ya da genler arası bölgelerinden kodlanırken bazı pre-miRNA'lar protein kodlamayan uzun mRNA'ların ekzonlarından ya da protein kodlamayan ve kodlayan genlerin intronik bölgelerden kodlanabilmektedir.

miRNA'lar ilk olarak olarak DNA'dan kodlanır bu işlem çekirdekte başlar ve sitoplazmada sonlanır. miRNA'nın biyogenezi; transkripsiyon, ayrılma, dışa salınım, daha fazla ayrılma, iplikçik seçimi ve mRNA ile etkileşim adımlarından oluşmaktadır. miRNA'yı kodlayan genler çekirdekte transkripte olduktan sonra bir veya daha fazla saç tokası içeren pri-miRNA transkriptlerini oluşturmak için RNA polimeraz II tarafından sentezlenir¹⁰¹. Bu pri-miRNA 5' ucunda 7-metil-guanilat şapkası ve 3' ucunda poli A kuyruğu taşır Pri-miRNA'lar Drosha adlı bir RNase III enzimi ve DGCR8/Pasha adlı bir dsRNA bağlayıcı protein (dsRBD) içeren bir multiprotein kompleksi tarafından kırılır. miRNA'nın biyogenezinde rol alan bu protein kompleksi 'microprocessor complex' olarak da adlandırılmaktadır^{94,102}. Kırılma sonucu 5'-fosfat ve 3'-2-nt çıkıntısı olan 70 nt uzunluğunda saç tokası yapında pre-miRNA oluşur. Daha sonra exportin-5 ve Ran-guanin-trifosfat (GTP) bağımlı bir mekanizma ile pre-miRNA'yı çekirdekten sitoplazmaya aktarılır. Bu translokasyonlu pre-miRNA'lar Dicer enzimi ile TRBP (Transactivation Response RNA-Binding Protein) ve PACT (Protein Activator of the Interferon-Induced Protein Kinase) ile kompleks oluşturarak ikinci bir RNase III endonükleaz aracılığıyla kırılır. Dicer enzimi ile kırıldıktan sonra olgun çift sarmallı yaklaşık 22-nt miRNA molekülünü serbest bırakmak için pre-miRNA'nın terminal halkasını kaldırır. Olgun miRNA'ların bir zinciri Argonaute (AGO) proteini ile etkileşime girer ve mRNA bozulmasını ve translasyonel baskılamayı ayarlayan RNA kaynaklı susturulmuş kompleksinde (RNA-Induced Silencing Complex; RISC) degrade olur. Bu oluşan yapıya pre-RISC adı verilir. Çift zincirli yapının iki ipliğinden biri ayrıldığında olgun RISC elde edilir ve bu işleme "zincir seçimi" adı verilir. Bu işlemin temel faktörü çift zincirli yapının ilk 4 nükleotidi tarafından belirlenir. Bu sebeple zayıf etkileşimli zincir ucu tercihen gevşeyerek klavuz zincir (guide strand) olarak kalır iken geçici zincir (passenger strand) parçalanacaktır (Şekil 4). Olgun RISC kompleksi sitoplazmada yüklü miRNA ile eşleşebilmesi için mRNA'yı bulur. miRNA; mRNA

eşleşmesi, mRNA'nın 3 'UTR'si (çevrilmemiş bölge) ile "eşleşme dizisi" (seed sequence) olarak bilinen miRNA'nın 2 ila 8 pozisyonlarındaki kısa bir nükleotit bölgesi arasındaki Watson-Crick etkileşimleri ile sağlanır. miRNA'nın bu genel prensibinin ötesinde mRNA etkileşimi, 5 'UTR ile miRNA eşleşmesi de tanımlanmış ve klinik olarak ilgi görmüştür¹⁰³⁻¹⁰⁵.

DNA dizisinin her zaman olgun miRNA için şablon olmadığını vurgulamak önemlidir. Çünkü insan miRNA'larının %6'sı RNA düzenlemesine sahiptir. Başka bir deyişle tek bir pre-miRNA uzunluğu ve diziliminde isomiR olarak adlandırılan farklı olgun miRNA'lar olabilir. Düzenleme işlemi mRNA hedef seçimini değiştirerek diğer hedefler için farklı afinite kazandıran "eşleşme dizisini" değiştirebilir. Bu bağlamda farklı izomiR'lerin hücreye özgü ekspresyonu bu miRNA varyantlarının hücre tipine bağlı olarak farklı protein ekspresyonu anlamına gelmektedir.



Şekil 4. miRNA'ların biyogenezi

2.13. miRNA ile İlişkili HBV Enfeksiyonu

Hücrel miRNA'lar kendi fizyolojik fonksiyonlarına bağlı olarak transkripsiyonel transaktivatör HBx proteini, HBV gen ekspresyonunu ve replikasyonunu negatif veya pozitif bir şekilde modüle edebilir. Bunu doğrudan viral transkriptleri hedefleyerek veya dolaylı olarak HBV gen ekspresyonu ve replikasyonu için gerekli kritik transkripsiyon faktörlerini ve konak immün sistemini düzenleyerek başarır. Çoğu miRNA HBV replikasyonu üzerinde inhibe edici bir etki göstermesine rağmen miR-1 dahil olmak üzere birkaç miRNA'nın HBV replikasyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Tüm olumlu ve olumsuz etkiler göz önüne alındığında, birlikte alındığında, miRNA'ların HBV enfeksiyonu üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu görülmektedir¹⁰⁶.

2.13.1. HBV Enfeksiyonunda İmmün Sistemini Düzenleyen miRNA'lar

Konak immün cevabı HBV enfeksiyonunun temizlenip temizlenmediğini kısmen belirleyen önemli bir faktördür. Bu ortamda HBV'nin antiviral bağışıklık tepkilerini bastırmak ve böylece replikasyonunu kolaylaştırmak için stratejiler geliştirmesi sürpriz değildir. İmmün sistemdeki rolleri keşiflerinden bu yana yoğun bir şekilde çalışılmış olan miRNA'ların son zamanlarda HBV enfeksiyonunda immün yanıtın düzenleyicileri üzerinde rol oynadığı gösterilmiştir¹⁰⁷. Birçok çalışmanın sonucu memeli organizmalarının interferon (IFN) sistemi sayesinde HBV enfeksiyonuna karşı savunmak için miRNA'ları kullanabileceği fikrini desteklemektedir. Örneğin, miR-155 sitokin sinyal 1 ekspresyonunun supresör etkisini baskılayarak ve ardından Janus kinaz / sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatör (JAK/STAT) yolağını aktif ederek doğal antiviral immüniteyi artırabilir ve böylece HBV gen ekspresyonunu inhibe edebilir. Bu yüzden onkogenik özelliği olan miR-155'in kalıcı bir şekilde yükselmesi hepatokarsinogeneze katkıda bulunabilir. miR-548 IFN- λ 1'in 3' ucunu hedeflemesi ile birlikte IFN- λ 1 ekspresyonunu inhibe ederek viral replikasyonu kolaylaştırır. İlginç bir şekilde endojen miR-548 seviyeleri HBV enfeksiyonu sırasında baskılanır ve bu, konağın viral enfeksiyona karşı koruyucu bir reaksiyonu olabilir. Bu miRNA'ların insanlarda antiviral savunmalarda rol oynadığı görülmesine rağmen virusların bu

miRNA'ları immün eliminasyondan kaçınmak ve kalıcı bir enfeksiyon oluşturmak için kendi replikasyonlarını bastırdığı iddia edilmektedir¹⁰⁸.

Buna karşın bazı miRNA'lar virus tarafından bağışıklık sistemini zayıflatmak için kullanılabilir. Wang ve ark. kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda upregüle miR-146a'nın doğrudan STAT1 mRNA'yı hedeflediğini ve kronik viral enfeksiyon sırasında immün cevaba katkıda bulunabilen zarar görmüş T-hücre fonksiyonuna yol açtığını ortaya koymuştur¹⁰⁹. Kemokin (C-C motifi) ligand 22'nin doğrudan regülatörü olan (CCL22) miR-34a HBV genomunun varlığında baskılanır. miR-34a'nın ekspresyonunun azalması CCL22 sayesinde düzenleyici T hücrelerinin düzelmesine sebep olur ve böylece efektör T hücrelerinin antiviral aktivitesini downregüle eder.

2.13.2. HBV Transkriptlerini Hedefleyen miRNA'lar

miR-32 antiviral aktivite gösteren ilk memeli miRNA'sıdır. Bu miRNA primat köpüklü virus tip 1'in ORF-2'sini hedefleyerek viral mRNA translasyonunu inhibe eder. Çalışmalarda miRNA'ların HBV gen ekspresyonunun veya replikasyonunun gen transkriptlerini doğrudan hedefleyerek baskıladığı gösterilmiştir¹¹⁰. HBV replikasyonunu etkileyen HBV transkriptlerinde hücrel miRNA'ların hedeflerini taramak için önceki çalışmalardan farklı iki yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntem, HBV gen ekspresyonunu düzenleyen miRNA'ların taranması ve daha sonra seçilen bu miRNA'ların bağlanma bölgesinin mevcut olup olmadığını belirlemek için bilgisayar yazılımı kullanarak HBV sekansları ile eşleştirilmesini içerir^{107,111}. HBV replikasyonunu ve gen ekspresyonunu etkileyen miRNA'ları tanımlamak için Zhang ve ark. HepG2 2.2.15 hücrelerini 328 tanımlı insan miRNA'sının antisens oligonükleotidleri ile transfekte ederek fonksiyon kaybı yaklaşımı kullanmış ve daha sonra HBsAg ekspresyon seviyesini ölçmüştür. Antisens oligonükleotidlerin transfeksiyonu sonucunda miR-184, miR-185, miR-196a, miR-199a-3p, miR-210 ve miR-217'nin HBsAg ekspresyonunda 1.4-1.6 kat artışa neden olduğunu göstermiştir¹¹². Biyoinformatik analiz kullanılarak yapılan bir çalışmada ise HBsAg kodlama bölgesinde ve HBV pre-S1 bölgesinde miR-199a-3p ve miR-210 için varsayılan bağlanma yerleri tespit edilmiştir¹¹². Başka bir çalışmada Chen ve ark. ilk önce miR-

122'nin HBV gen ekspresyonu ve replikasyonu üzerindeki inhibitör etkisini göstermiş ve sonra HBV pre-C mRNA ve pregenomik RNA'nın üst üste binen bölgesi içindeki miR-122 hedefini tahmin etmek için bilgisayar programları (RNA22, miRanda ve TargetScan algoritmaları) kullanmıştır. Ayrıca miR-15a ve miR-17-92'nin viral transkriptleri hedef alarak HBV replikasyonunu inhibe edebileceği gösterilmiştir¹¹³.

Buna karşılık, ikinci yöntem ilk olarak bilgisayar yazılımı kullanılarak HBV dizilerindeki insan miRNA'larının potansiyel hedeflerini ardından insan miRNA'larına karşı duyarlılık için bu öngörülen hedeflerin doğrulanmasını içerir. Potenza ve ark. bilgisayar programı miRanda, miRBase'de listelenen insan miRNA'larının hedef bölgelerinin varlığı için HBV alt tiplerinin genomlarını taramak için kullanmıştır. Araştırmacılar viral polimeraz ORF ve örtüşen yüzey antijeni ORF'de kümelenmiş 7 umut verici hedef bölgesi bulmuştur. Bu miRNA'lar arasında hsa-miR125a-5p HBV genomunun 3037-3065 segmentini susturarak ve viral yüzey antijen mRNA'larının translasyonunu engelleyerek salgılanan HBsAg miktarını azaltmıştır¹¹⁴.

2.13.3. HBV Enfeksiyonunda miRNA Regülatörü

HBV transkriptleri dört promotör ve iki enhancerin (Enhancer I ve II) kontrolü altındadır HBV transkripsiyonunu düzenlemek için birkaç transkripsiyon faktörünün ve nükleer reseptörün promotör/arttırıcı elementlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Bazı miRNA'lar bu transkripsiyon faktörlerini hedefleme yeteneğine sahiptir ve bu yeteneğinden dolayı HBV gen ekspresyonunu ve replikasyonunu inhibe ederler. CAAT arttırıcı bağlanma proteini (C/EBP) HBV arttırıcı II ve kor promotörünü bağlayarak ve artırarak HBV transkripsiyonunu başlatır. Doğal bağışıklığın düzenlenmesi dışında, miR-155'in HBV transkripsiyonunun downregülasyonu ile sonuçlanan C/EBP'yi negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir. Protein kinaz cAMP'ye (siklik adenosin monofosfat) bağımlı katalitik β , cAMP cevap element bağlayıcı proteinin (CREB) fosforilasyonunu indükleyebilir ve CREB'nin HBV promotöründen ayrılmasına sebep olabilir. CREB'nin HBV promoterine bağlanması HBV replikasyonu ve gen ekspresyonu için gerekli olduğundan CREB'nin dolaylı fosforilasyonu ile onun regülatörü olan miR-372 HBV transkripsiyonunda downregülasyonu ile sonuçlanır¹⁰⁷.

HBV promoterlerini bağlayan ve aktive eden peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör alfa (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha; PPAR α) HBV replikasyonunda kritik bir role sahiptir. miR-141 mimikleri ile yapılan transfeksiyon PPAR α ekspresyonunu hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde baskı yapabileceğini göstermiş daha sonra HBV promotör transkripsiyon aktivitelerini inhibe ederek HBV replikasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. p53 HBV arttırıcı elementlere bağlanabilir ve HBV replikasyonunun baskılayıcı olarak görev yapabilir. P53'ün HBV replikasyonu üzerindeki inhibitör etkisi siklin G1'in p53 ile etkileşime girmesini ve HBV arttırıcı elementlere spesifik bağlanmasını bloke etmesini önleyen miR-122 ile korunur. Anti-HBV enzimi olan hem oksijenaz-1 (HO-1) miR-122 ile aynı anda hedeflenir. Bu nedenle miR-122 HO-1 aracılı antiviral aktiviteye baskı yaparak da HBV enfeksiyonunu başlatabilir¹¹⁵.

Bunun aksine başka miRNA grubu HBV replikasyonunu negatif olarak düzenleyen proteinleri hedefleyebilir. HBx bağlayıcı bir protein olan HBxIP, HBV replikasyonunu transaktivasyonu için gerekli bir alan ile etkileşime girerek azaltabilir. Ancak miR-501 HBxIP ekspresyonunu negatif olarak düzenleyerek HBV replikasyonunu kolaylaştırabilir. Transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör I/B (NFIB) HBV genomunda arttırıcı I ve HBV kor promotörünü inhibe ederek viral kor ile ilişkili DNA seviyelerinin yanı sıra viral HBsAg ve HBeAg protein seviyelerini azaltır. Bununla birlikte NFIB'nin antiviral aktivitesi onun regülatörü olan miR-372/373 tarafından kaldırılmıştır. Epigenetik modifikasyonlar genellikle DNA metilasyonunu ve histon modifikasyonunu içerir. Birçok miRNA'nın HBV enfeksiyonu sırasında hedef genlerinde epigenetik modifikasyonlara dahil olduğu görülmüştür. miR-1 histon deasetilaz 4 (HDAC4)'ü etkileyerek HBV replikasyonunu dolaylı bir şekilde artırabilir. Ayrıca miR-1 ile transfeksiyon HepG2.2.15 hücrelerinde HDAC4 protein ekspresyonunu baskılar. Sonuç olarak, HDAC4'ün downregülasyonu HBV kor promotörüne bağlanan HBV transkripsiyonunu ve replikasyonunu artırabilen farnesoid X reseptörü a'nın upregülasyonu dahil olmak üzere birçok transkripsiyon faktörünün ekspresyonunda değişikliklerle sonuçlanır. Ayrıca histon modifikasyonuna katılan miRNA'lar viral cccDNA metilasyonunu da etkilerken HBV replikasyonunu düzenler. miR-152'nin DNA metiltransferaz-1'i (DNMT-1) hedefleyerek ekspresyonunu azalttığı

bildirilmiştir. DNMT'lerin ekspresyonundaki değişiklikleri viral DNA metilasyonunu başlatarak HBV gen ekspresyonunu ve replikasyonunu etkilediği gösterilmiştir^{107,116}.

2.14. HBV ile İlişkili HCC'de miRNA'lar

Kronik HBV enfeksiyonu HCC için bir risk faktörüdür. Artan kanıtlar, HBV'nin seçilmiş miRNA'ları upregüle ya da downregüle ederek HCC gelişimini başlatan konak gen ekspresyonunu değiştirdiğini göstermektedir. Connolly ve ark. HBV ile ilişkili siroz karaciğerlerin HCC dokusunun ve normal karaciğer dokusunun miRNA profillerini taramış, siroz ve HCC dokusunda miR-17-92 polistinin ve miR-21'in ekspresyonu upregüle olarak bulmuştur¹¹⁷. Gao ve ark. HBV ile ilişkili hepatokarsinogenezisin erken evrelerinde kansere bağlı 7 miRNA'nın ekspresyon değişikliklerini araştırmıştır. miR-145 ve miR-199b'nin kalıcı bir downregülasyonunun yanı sıra malign öncesi displastik nodüller ve HCC gelişimi ile ilişkili miR-224'ün upregülasyonu bulmuştur. Diğer araştırmalar bu miRNA'ların HCC hücre proliferasyonu, göçü ve invazyonu olabileceğini ve ekspresyonundaki değişikliklerin HCC gelişiminde erken olaylar olduğunu göstermiştir¹¹⁸.

2.14.1. miRNA'ların Düzensizliği

HBV ile ilişkili HCC'de miRNA'ların düzensizliğinin sebebi tam olarak anlaşılmamasına rağmen mevcut bulgular HBV'nin özellikle HBx'in bu miRNA'ların düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir. HBx hücre çoğalması, hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz, metastaz ve genetik stabilite ile ilişkilidir. HBx miRNA işleminin birden fazla aşamasına etki ederek miRNA ekspresyonunu etkiler. Transkripsiyonel seviyede HBx miRNA transkripsiyonu için gerekli olan transkripsiyonel faktörlerini düzenler¹⁰⁷. İnsan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan ve tümör baskılayıcı olan p53 miR-23a, miR-34, miR-125b, miR-148a, miR-192 ve miR-200 gibi miRNA'ların promoterlerine bağlanarak bu miRNA'ların düzenlenmesini sağlar. Bununla birlikte, HBx p53 ile etkileşime girerek etkisiz hale gelir, bu da miRNA'ların ekspresyonunun downregüle olmasına yol açar. P53'e ek

olarak HBx NF- κ B ve c-Myc gibi diğ er bazı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu inhibe ederek miRNA ekspresyonunu d zenler¹¹⁹. Anormal DNA metilasyonu epigenetik mekanizmanın düzenleyicileri olarak görev yapan miR-10a ve miR-196b'nin düzensiz ekspresyonundan kaynaklandığını gösterilmiştir. HBx tarafından miRNA gen promotörlerinde epigenetik modifikasyonlar, düzensiz miRNA'ların altında yatan başka bir önemli mekanizmayı temsil eder. PPAR γ ve retinoid X reseptörü alfa (RXR α) bağlayıcı kompleks miR-122'nin gen promotörüne bağlanabilir ve miR-122 transkripsiyonunu artırabilir. DNA metilasyonu muhtemelen miR-122 ekspresyonunda negatif bir role sahiptir.      HCC hücrelerinin DNA metilasyon inhibitörleri ile tedavi edilmesi PPAR γ veya RXR α ile birlikte miR-122 gen promotörün ilişkisini artırabilir ve miR-122'yi upregüle edebilir¹²⁰. HBx ile indüklenen promoter hipermetilasyonu miR-205 ve miR-132 ekspresyonunun düzenlenmesinde de rol oynar. miRNA destekleyicileri  zerindeki CpG adalarının metilasyonuna ek olarak HBx ile indüklenen histon modifikasyonu miRNA'ların düzensizliğine katkıda bulunur. p300 gibi hücresel histon asetil transferazlar ve HDAC1 gibi histon deasetilazlar HBx tarafından düzenlenmektedir. Bir çalışmada p300 aşırı ekspresyonunun HCC'li hastalarda gözlenen miR-224 ekspresyonunun upreg lasyonundan kısmen sorumlu olabileceği bulunmuřtur¹²¹. Ayrıca HBx miR-139-5p, miR-125b, miR-101 ve let-7c de dahil olmak üzere birçok anti-metastaz miRNA'lar epigenetik bir şekilde susturan histon lizin metil transferaz olan zeste homolog 2'nin arttırıcısını düzenleyebilir. HBx dışındaki viral proteinlerin de hücresel miRNA profillerini etkilediği bulunmuştur. HepG2 hücrelerinde HBsAg'nin aşırı ekspresyonu 133 miRNA'ları upregüle ederken 9 miRNA'yı downregüle eder. Ayrıca HBx viral RNA'da bazı miRNA'ların düzensizliğine aracılık eder. miRNA kodlayan genler genomun kırılğan bölgelerinde bulunduğundan HBV DNA'nın konak kromozomlara sık entegrasyonu kromozomal kararsızlığı artırabilir, bu da miRNA'ların düzensizliğine sebep olabilir^{107,122}.

2.14.2. miRNA'ların Tümör Baskılayıcıları  zerindeki Deaktivasyonu

Tümör baskılayıcılar genellikle HCC'nin başlatılmasında ve ilerlemesinde genetik ve epigenetik mekanizmalar yoluyla etkisizleştirilir. Bununla birlikte miRNA aracılı susturma, tümör baskılayıcıların kaybının altında yatan başka bir önemli

mekanizma olabilir. Örneğin, miR-21, hücre apoptozunu indükleyen tümör baskılayıcı olan programlanmış hücre ölümü 4'ü (PDCD4) hedeflediğinden onkojenik miRNA olarak tanımlanmıştır¹⁰⁷. miR-21'in HBx tarafından düzenlenmesi PDCD4'ü baskılamakta ve sonunda hepatokarsinogeneziyi başlatmaktadır. Östrojen reseptörü α (ER α) dişileri östrojen sinyal yolu ile hepatokarsinogenezden korur. Potansiyel olarak doğrudan ER α 'yı hedef alan miR-22 ve miR-18a gibi bazı miRNA'ların aşırı ekspresyonundan dolayı östrojenlerin koruyucu etkilerini zayıflatır. Bu sebepten dolayı ER α HCC'lerde önemli ölçüde downregüle edilir. Bunun aksine androjen yolunun aşırı aktivasyonu erkeklerde hepatokarsinogenezde tümör teşvik edici bir faktör olarak görev alır. Chen ve ark. androjen reseptörü (AR) ekspresyonunun HBV ile ilişkili HCC erkek hastaların karaciğer dokularında önemli ölçüde arttığını, bu hastalarda yüksek androjen yolu aktivitesi olduğunu göstermiştir. Transkripsiyon faktörü olan AR promotör bölgelerinde karşılık gelen androjen cevap element (ARE) kalıntıları ile bağlanarak hedef genlerini aktive eder¹²³.

2.14.4. miRNA'ların Onkojen Ekspresyonunu Başlatması

Onkogenlerin artan ekspresyonu hepatokarsinogeneze katkıda bulunan bir diğer önemli faktördür. Daha önceki çalışmalarda bazı onkogenlerin regülasyonundan doğrudan sorumlu olan bir miRNA kümesi tanımlanmıştır. Örneğin, keşfedilen ikinci miRNA olan let-7'nin c-Myc, RAS, yüksek hareketlilik grubu AT-hook 2 ve STAT3 içeren bir onkogen kümesinin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, HBx varlığında let-7 ekspresyonu bastırılarak hedef onkogenlerinin aşırı ekspresyonu ve hepatokarsinogenezin başlatılması sağlanır. Hipofiz tümörünü dönüştüren gen 1 (PTTG1) bağlanma faktörü (PBF), nükleer translokasyonunu kolaylaştırarak PTTG1'in transkripsiyonel aktivitelerini artırır. Bu da HCC hücresi büyümesine ve invazyonuna yol açan VEGF, c-Myc ve MMP-2 gibi PTTG1'in hedef genlerinin ekspresyonunu artırır. Normal olarak PBF ekspresyonu karaciğerde spesifik olan miR-122 ile baskılanır. Ayrıca HCC'de miR-122'nin downregülasyonu PBF'nin ektopik olarak eksprese edilebilir. miR-15b'nin ekspresyonu HBx tarafından baskılanır, bu durum miR-15b, fukosiltransferaz 2 (FUT2) 'nin hedef geninin ekspresyonuna izin verir. Upregüle olan FUT2 daha sonra onun aşağı yönde olan protein Globo H'yi aktive

ederek HCC hücre çoğalmasına neden olur. Bu sonuçlar HBx, miRNA'ları kullanarak tümör oluşumunu teşvik ettiğini göstermektedir. miRNA'lar ayrıca anahtar hücre döngüsü düzenleyicileri ile etkileşime girebilir ve hücre döngüsü ilerlemesini düzenleyebilir. Siklin G1'in miR-122 ile regüle edildiği ve miR-122'nin downregülasyonunun hücre döngüsünü hızlandırdığı gösterilmiştir. miR-16 ailesi siklin D1'yi hedefleyebilmek G1 fazında hücre döngüsünü durdurabilir. miR-26a ve miR-195 siklin D1, siklin D2, siklin E2, CDK6 ve E2F transkripsiyon faktörü 3 gibi birçok molekülü bastırarak G1/S geçişini bloke edebilir. Bu miRNA'ların downregülasyonu hücre döngüsü kontrolündeki eksiklikten dolayı HCC'nin gelişmesine ve ilerlemesine sebep olur¹⁰⁷.

Anormal epigenetik kontrol HCC ilerlemesinde yaygın olarak görülen bir olaydır. miRNA ekspresyonunun HBx tarafından epigenetik düzenlenmesine ek olarak birçok miRNA kendi epigenetik mekanizmasını düzenleyerek bazı tümör baskılayıcılarını epigenetik bir şekilde susturabilir, ardından hepatokarsinogenezisi başlatabilir. miR-152'in DNA metil transferaz 1 (DNMT1)'i düzenleyerek epigenetik modifikasyonda yer aldığı gösterilmiştir. Kansersiz olmayan karaciğer dokularındaki ekspresyonu ile karşılaştırıldığında, miR-152 HBV ile ilişkili HCC dokularında sıklıkla downregüle edilir. miR-152'nin azaltılmış ekspresyonu hedef gen DNMT1'in ekspresyonunun artmasına neden olur, bu daha iki tümör baskılayıcı gen olan glutathion S-transferaz pi 1'in (GSTP1) ve E-cadherin 1'in metilasyon seviyelerini artırır. DNA metiltransferazı olan DNMT3A miR-101 ile düzenlenir. Bu miRNA baskılandığında HCC hücrelerinde GSTP1, Ras birliği (RalGDS/AF-6) domain ailesi üyesi 1 ve sikline bağlı kinaz inhibitörü 2A dahil olmak üzere birçok tümör baskılayıcı genin anormal DNA metilasyonuna neden olabilir. Ayrıca bir histon lizin metiltransferaz olan EZH2 aynı zamanda tümör baskılayıcı miR-101'in doğrudan hedefidir. HDAC'lerin (asetil gruplarını histon proteinlerinden uzaklaştıran enzimler) tümör baskılayıcı gen transkripsiyonunu inhibe ederek onkogenler olarak işlev görmesi önerilmektedir. HDAC2 miR-145, HDAC4 ise miR-22 tarafından düzenlenir. Bu miRNA'ların bastırılmış ekspresyonu histon deasetilazların aşırı ekspresyonu ve HCC tümörogenezinin başlaması ile sonuçlanır. miRNA'lar genellikle tümörün başlangıcında ve ilerlemesinde yer alan bir sinyal yolunun aktivasyonu ile sonuçlanan protein

fosforilasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan genlerin ekspresyonunu da düzenleyebilir^{107,124}.

2.14.5. miRNA'ların Metastazı

HBV ile ilişkili HCC'nin kötü prognozu ve hastanın sağkalımı temel olarak tümör hücrelerinin invazyonu ve daha yüksek mortaliteye neden olabilecek metastazdan kaynaklanır. Tümör metastazı HCC'li hastaların klinik yönetimini etkileyen en önemli süreçlerden biridir. HCC'deki matris metaloproteinazlar gibi bazı adezyon moleküllerinin modifikasyonu karakterize edilmiş ve bu modifikasyonlar HBV ile ilişkili HCC'de tümör hücrelerinin göçüne katkıda bulunabilmiştir. Bu arada son zamanlarda yapılan birkaç çalışma HBC'nin HCC hücre metastazı geliştirmek için miRNA'ları düzenlediği başka mekanizmalar da göstermiştir. Bu bulgular hepatokarsinogenezin anlaşılmasını sağlamıştır. Budhu ve ark. HCC'li 241 hastanın kanserli ve kanserli olmayan örneklerinin miRNA ekspresyon profilleri incelenmiş 20 miRNA metastaz profili oluşturmuştur. Bu miRNA'ların hasta sağkalımı ve hastalığın tekrardan nüksetmesi anlamlı bir korelasyon göstermiştir¹²⁵. HBV ile ilişkili HCC'li hastalar arasındaki dizi bilgisi ve paralel miRNA ve mRNA ekspresyon verilerini karşılaştırarak yapılan çalışmada miR-16, miR-30a, let-7e ve miR-204'ü HBV ile ilişkili HCC metastazına katkıda bulunan temel miRNA düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır¹²⁶.

2.14.6. miRNA'lar ve Epitel-Mezenkimal Geçiş

Polarize hareketsiz epitel hücrelerinin hareketli mezenkimal hücrelere dönüştürüldüğü epitel-mezenkimal geçiş (EMT) işlemi sık sık aktive edilir ve tümör invazyonu ve metastazının başlaması ile ilişkilendirilir. EMT hücre adezyonunun kaybı, epitelyal markırların (E-cadherin, okludinler ve claudinler) downregülasyonu ve mezenkimal markırların (vimentin, fibronektin, N-cadherin) upregülasyonu ile karakterizedir. Dönüştürücü büyüme faktörü-y (TGF-y), Wnt ve reseptör tirozin kinaz (RTK)-aracılı yolların dahil olduğu birçok onkojenik yolun EMT'yi indüklediği

gösterilmiştir. EMT ile ilişkili HCC metastazını düzenlemek için bu yolların düzenlenmesinde çok sayıda miRNA yer almaktadır¹⁰⁷.

2.15. miRNA'ların Klinik Uygulaması

miRNA'ların HCC hastalarının erken teşhisi, sınıflandırılması ve prognostik sınıflandırması için patolojik biomarker olarak klinik önemi olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca kendi başına miRNA'lar veya anti-miRNA oligonükleotitleri hepatoselüler fonksiyonları modüle etmek için kullanılabilir. Bu, HCC hastalarının tedavisi için hedeflenen moleküler terapi olarak miRNA'ların terapötik potansiyelini gösterir¹²⁷.

2.15.1. HCC Tanısı için Biomarker Olarak miRNA'lar

miRNA'ların farklı ekspresyon seviyeleri normal karaciğer ve karaciğer kanseri dokuları, preneoplastik ve neoplastik lezyonlar ayrıca karaciğer kanseri ve diğer solid tümör tipleri arasında gözlenmiştir. Bu farklılıklar sadece tümör içinde değil aynı zamanda HCC hastalarının kanında da vardır. Serum miRNA'ları RNaz sindirimine özellikle dirençlidir. Bu, dolaşımdaki miRNA'ların klinik biomarker olarak görev yapmak için yeterince kararlı olduğunu gösterir. Serum miRNA'larındaki dalgalanmalar doğrudan lezyon şiddetiyle ilişkilendirilmiştir¹²⁸. Bu bulgular katı insan kanserlerinin tespiti için yeni bir potansiyel yaklaşım olarak tümör kaynaklı miRNA'ların serum bazlı ölçümünü destekleyen kanıtlar sunmaktadır. Kimyasal olarak uyarılmış hepatotümörigenez sıçan modelini kullanarak hepatoselüler adenom ve HCC gibi neoplastik ve preneoplastik lezyonlarda olan serumda dolaşımdaki miRNA'ların anormal sirkülasyonu gözlenmiştir. Dolaşımdaki çeşitli miRNA'lar (let-7a, let-7f, miR-34a, miR-98, miR-331, miR-338 ve miR-652) hepatotümörigenezin ilerlemesi sırasında kademeli olarak yükselmiştir. Serum let-7a, let-7f ve miR-98 düzeyleri hepatokarsinogenezin çok erken evrelerinde bile belirgin şekilde artmıştır. Böylece bu miRNA'lar HCC gelişiminin ilerlemesini izlemek için kullanılabilir^{127,129}.

Plazma miRNA ekspresyon profilleri sağlıklı kişilerde ve kronik HBV, siroz veya HBV-HCC hastalarında analiz edilmiştir. Bir miRNA panelinin (miR-122, miR-

192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a ve miR-801) kanser evresinden bağımsız olarak HCC'nin yüksek tanısal doğruluğunu sağladığı kanıtlanmıştır. Bu miRNA paneli ayrıca HCC hastalarını kronik hepatit B, siroz veya sağlıklı kontrollerden ayırarak erken evrede HCC'yi teşhis etmek için kullanılır. HCC ve karaciğer sirozu olan hastalarda plazma miRNA profilleri sırasıyla 22 ve 26 miRNA'ların belirgin bir şekilde upregüle olduğu gözlenmiştir. Hiyerarşik kümeleme analizi ayrıca farklı hasta gruplarındaki plazma havuzlarının farklı miRNA spektrumlarına sahip olduğunu göstermiştir¹³⁰.

HBV'li hastaların profilini çıkarıldıktan sonra HCV, HBV ile ilişkili HCC ve kontrol gruplarında 13 miRNA'ların HBV serumunda diferansiyel olarak eksprese edildiği bulunmuş ve 6 tanesi HBV ile ilişkili HCC'de anlamlı şekilde upregüle olmuştur. Ayrıca miR-23b, miR-423, miR-375, miR-23a ve miR-342-3p veya miR-25, miR-375 ve let-7f'nin paneli HBV ile ilişkili HCC'yi kontrol grubundan ayırabilir. miR-10a ve miR-125b'nin kombinasyonu HBV ile ilişkili HCC'yi HBV enfeksiyonundan ayırt edebilir. miR-16, miR-195 ve miR-199a'nın tek başına veya serum markerleri ile birlikte HCC'yi kronik karaciğer hastalıklarından ayırmaya yardımcı olabilir. miR-21, miR-221, miR-222 ve miR-224, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında HCC hastalarından alınan serumlarda aşırı eksprese edilmiş ve tümör boyutu, siroz ve tümör evresi ile pozitif korelasyon gösteren miR-221 yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Bununla birlikte kronik hepatitli hastalarda yüksek miR-21, miR-122 ve miR-223 serum seviyeleri görülmüştür¹³¹.

2.15.2. HCC'nin Ayırıcı Tanısında Biomarker Olarak miRNA'lar

HCC'yi karaciğerin metastatik tümörlerinden ayırt etmek klinikte prognostik ve terapötik uygulamalar için önemlidir. Bu ayırıcı tanı zor olabilir. Çünkü karaciğerin metastatik tümörleri, özellikle adenokarsinomlar, HCC'nin morfolojisi ve immüno-regülasyonunu taklit edebilirler. Her ne kadar modern patolojik ve ileri görüntüleme teknolojisi gibi mevcut klinik tanı prosedürleri karaciğer kanseri tanısını iyileştirmiş olsa da kanserin primer bölgesi birçok hastada otopsi sonrasında bile bilinmemektedir. Bu nedenle özellikle HCC veya metastatik adenokarsinomların göstergesi olan moleküler biomarkerların kullanılması fayda sağlamaktadır¹²⁷.

miRNA'lar primer HCC, epitelyal kökenli primer tümörler, epitelyal kökenli karaciğerdeki metastatik tümörler ve bilinmeyen kökenli karaciğer adenokarsinom metastazları içeren tümörlerde spesifik biomarkerları tanımlamak için profilendirilmiştir. miR-122'nin ekspresyonu karaciğere özgü olmasına rağmen miR-122'nin iyi bir tanısal belirteç olarak kullanılması dışında bitişik karaciğer dokularından kaçınılmaz kontaminasyon nedeniyle karaciğer metastazı örneklerinde yüksek miR-122 seviyeleri bulunmuştur. miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 ve miR-429'u içeren miR-200 ailesinin üyeleri gastrointestinal kanaldaki epitelyal kökenli primer tümörlerde güçlü bir şekilde eksprese edilir, ancak HCC'de bulunmazlar. Buna karşılık miR-126 HCC olmayan metastatik tümörlere kıyasla HCC'de aşırı eksprese edilir. miR-200c ve miR-141 veya miR-126 kombinasyonu HCC olmayan ve HCC örnekleri arasında ayrım yapabilir. miR-205 ve miR-194 gastrointestinal ve gastrointestinal dışı epitelyal kökenli primer tümörleri tanımlayabilir. Bu veriler karaciğer metastazının kökenlerini farklılaştırma ihtimalini gösteren güçlü kanıtlar sunmaktadır. Patolojik incelemeler dışında bu miRNA'ların ekspresyon profilleri karaciğerdeki metastatik adenokarsinomlardan primer HCC'yi tanımlamak için daha duyarlı, güvenilir ve doğru olan alternatif bir yaklaşım sunar^{127,132}.

2.15.3. HCC Prognozunun Belirleyicisi Olarak miRNA'lar

Postoperatif HCC hastaları için metastaz ve tekrardan nüksetme uzun süreli sağkalımın önündeki en büyük engellerdir. Bu işlemlerle ilişkilendirilen moleküler biomarkerlar klinik olarak hastalık prognozunda faydalı olabilir. HCC prognozunda tümörlü ve tümörsüz dokular arasında farklılaşabilen miRNA bazlı moleküler biomarkerlar kullanılmıştır. miR-139-5p ekspresyonu kronik hepatit veya sirozlu tümörsüz karaciğerlerden erken evre HCC'ye kadar HCC ilerlemesi sırasında belirgin şekilde azalır. Ayrıca miR-96 seviyeleri sağlıklı karaciğerden alerjik olmayan karaciğer dokularına ilerlerken kademeli olarak artar ve aşırı tümörlü dokularda en yüksek seviyelere ulaşır. miR-222'nin HCC dokularında upregüle olması HCC'nin ileri aşamaları ile pozitif korelasyon gösterir. Birçok dokularda intrahepatik metastazlı HCC hastalar ve metastaz olmayanlardan ayıran 20 miRNA belirlenmiştir. Bu miRNA'lar HCC hastalarının ve erken evre HCC hastalarının hayatta kalmasıyla ilişkilidir ve

tekrardan nüksetmeyi belirlemek için kullanılabilir. Analizler 20 miRNA belirleyicisinin metastaz ve tekrardan nüksetme risklerini değerlendirmek için bir hayatta kalma belirleyicisi olarak potansiyelini ortaya çıkaran tümör büyüklüğü, tümör kapsülleme, mikrovasküler invazyon ve tümör lenf nodu metastaz (TNM) evresi ile anlamlı ve pozitif bir şekilde ilişkili olduğunu ortaya koymuştur^{127,133}.

2.15.4. HBV ile İlişkili HCC Tedavisinde miRNA'lar

Tanısal sonuçlara ek olarak anormal şekilde eksprese edilen miRNA'lar HCC tedavisinde umut verici bir potansiyele sahiptir. miRNA fonksiyonunu düzenlemeye dayalı yeni terapötik stratejiler onkojenler olarak etki eden miRNA'ların ekspresyonunu düşürmek ve tümör baskılama yapan miRNA'ların ekspresyonunu hızlandırmak için tasarlanmıştır. Bununla birlikte, aktif miRNA'ların vücuttaki spesifik hedef bölgeye verilmesi kontrol edilebilir. miRNA tedavisinin etkinliğini arttırmak için dolaşım sistemine odaklanan çeşitli stratejiler araştırılmıştır. Özellikle NP'ler vektör salınım yöntemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü kanser tedavisi için immünojenik olmayan, hücre ve dokuya özgü bir taşıyıcı sistemi kurulmasına yardımcı olurlar. Hem sentetik miRNA mimikleri hem de anti-miRNA'lar NP'lerle konjüge edilebilir, bu da onları nükleaz bozulmasına karşı daha dirençli hale getirir ve çıplak miRNA iletimi ile bağlantılı immün cevabın azaltılmasına sebep olurlar. Üstelik hedef ligand NP'lerin yüzeyine tutunduğundan NP'ler kullanılarak terapötik miRNA'nın verilmesi çıplak miRNA iletimi ile karşılaştırıldığında daha spesifiktir¹³⁴. Ekspresyon vektörlerinde kodlanan miRNA'lar veya miRNA mimikleri içeren oligonükleotitler kullanarak miRNA seviyelerinin geri kazanılması belirli miRNA'ların seviyelerinin arttırılması için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. miRNA mimikleri miRNA benzeri bir şekilde hedef mRNA'ları düzenleyebilen sentetik oligonükleotitlerdir. Tümör baskılayıcı olarak görev yapan ve downregüle edilen miRNA'lar hücreleri normal bir duruma döndürmek için dışsal olarak iletebilir. Hsu ve ark. HCC hücrelerinde ve HCC fare modelini miR-122 ekspresyonunu eski haline getirmek için bir katyonik lipit NP formülasyonunu kullanmıştır. Bu NP ilişkili miR-122 dağılımı in vitro da miR-122 hedef genlerinin >% 95 oranında azaldığını ve sistemik toksisiteye neden olmadan 30 gün içinde HCC ksenograftlarının yaklaşık %50 oranında büyümeyi baskıladığını

göstermiştir¹³⁵. Wang ve ark. oleik asidin lipid bazlı NP'lere dahil etmesi ile birlikte miR-122 ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığını ve bir miR-122 hedefi olan Bcl-w ekspresyonunu azalttığını bulmuştur¹³⁶. Liang ve ark. HepG2 hücrelerinde miR-26a transfeksiyonu ve indüklenmiş hücre döngüsü durmak için vektör olarak yeni bir tür poli bazlı NP kullanmıştır. Bu nanokompleksler düşük sitotoksosite ile daha yüksek bir transfeksiyon etkinliği göstermiş ve transfeksiyondan sonra tümör hücrelerinde birikmiştir. Bu komplekslerin DNA'nın hücresel olarak alınmasına katkıda bulunduğunu ve miR-26a'nın hücre döngüsünün durdurulmasını indükleyerek tedavi etkisini arttırdığı görülmüştür¹³⁷. Başka bir çalışmada Li ve ark. tümör içine kolesterol konjuge miR-99a mimiklerinin enjekte edilmesinin HCC taşıyan farelerde AFP seviyelerinin yanı sıra tümör büyümesini de önemli ölçüde inhibe ettiğini bildirmiştir¹³⁸. Bu çalışmalar sırasında miRNA'ların viral taşınımında araştırılmıştır. Kota ve ark. adenovirusun vektör olarak kullanılması sistemik miR-26a uygulamasının HCC'nin bir fare modelinde kanser hücresi proliferasyonu, tümöre özgü apoptozun indüklenmesine ve minimal toksisite ile hastalığın progresyonunun dramatik bir şekilde korunmasına yol açtığını göstermiştir. Bu çalışma düzensiz bir miRNA'nın ekspresyonunun düzenlenmesi spesifik olarak tümör hücrelerini etkilediğini normal dokunun ise etkilenmediğini göstermiştir. Bu antikanser miRNA ajanları arasında gelişiminde en uzak olan karaciğer kanseri tedavisi için klinik deneylerde bulunan lipozom formüllü miR-34'ün mimiği MRX34'tür¹³⁹.

Tümör baskılayıcı miRNA'ların restore edilmesi HCC tedavisi için bir yaklaşım olsa da antisens oligonükleotitlerle onkogen miRNA'ların baskılanması veya bloke edilmesi başka bir tedavi stratejisi olarak kabul edilebilir. Anti-miR'lerin fonksiyonu için hücresel alım ve sitoplazmaya dahil edilmeleri gerektiğinden taşıyıcının transfeksiyon etkinliği büyük bir sorundur. Belirli hücelere dağıtım için özel olarak tasarlanmış NP'ler bu amaca yardımcı olacaktır. miR-155 HCC'de sıklıkla aşırı eksprese edilen bir onkogenik miRNA'dır. Zhang ve ark. anti-miR-155'in laktosillenmiş gramikidin içeren lipid NP'leri kullanarak verilmesinin HCC hücrelerinde miR-155 hedef genlerinin ekspresyonunu belirgin şekilde düzenleyebileceğini göstermiş, karaciğere özgü bir taşıyıcı araç kullanarak anti-miR tedavisi potansiyelini ortaya koymuştur¹⁴⁰.

HCC tedavisinde doğrudan etkilere ek olarak miRNA tedavisi kemoterapi ile birleştirilebilir ve böylece tümörlerin bu anti-kanser ajanlarına karşı duyarlılığı arttırılabilir. miR-122 çoklu ilaç direnç genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek HCC hücrelerini doksorubisin tedavisine duyarlı hale getirebilir. Benzer şekilde miR-199a-3p, mTOR ve c-Met ekspresyonunu etkileyerek doksorubisin tedavisinin HCC üzerindeki etkisini arttırmaktadır. Let-7 ailesi, HCC hücrelerinde Bcl-xL ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla sorafenib ile indüklenen apoptozu güçlendirebilir. Ayrıca miR-101 apoptozu indükleyerek ve tümör hücrelerinde otofajiyi inhibe ederek doksorubisin ve floroürasil tedavisini sinerjize edebilir. Buna karşılık, antiviral ilaçlar ile birleştirilen miRNA tedavisi HBV tedavisi için umut verici bir keşif alanı olabilir. Bu kavram HCV enfeksiyonunun tedavisinde miRavisen'i antiviral ilaçlar ile telaprevir ve ribavirin ile birleştiren bir faz II klinik çalışmasında uygulamaya konulmuştur^{141,142}.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Radyoloji Polikliniğine başvuran 35 HBV ile ilişkili HCC tanısı almış hastalardan ve Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniğe gelen 35 kronik HBV'li hastalardan 2016-2019 tarihleri arasında kan örneği ve bu hastalara ait doku örnekleri Patoloji Anabilim Dalı'ndan toplanmıştır. Çalışmamıza ayrıca 30 sağlıklı bireylerden kan örneği ve karaciğer fibroz skoru 1 olan hastaların doku örnekleri kontrol grubu olarak toplanmıştır.

Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan "Etik Kurul Onayı" alınmıştır. Hastaların demografik verileri, HBV'un HBsAg ve HBV DNA miktarı, Biyokimyasal değerleri (ALT ve AST), AFP değeri ve karaciğer fibroz skoru hazırlanan anketlere doldurulmuştur. Toplanan kan ve doku örneklerinde miScript SYBR® Green PCR Kiti (Qiagen, Germany) kullanılarak kantitatif real-time PCR yöntemi (qRT-PCR) ile miRNA ekspresyon profilleri araştırılmıştır.

Hastalardan yaklaşık 5 mL kadar kan örneği alınmıştır. Serum kısmının eldesi için kan örnekleri 5.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmış ve örnekler çalışılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

3.1. Serum Örneklerinden miRNA İzolasyonu

Serum örneklerinden miRNA izolasyonu için miRNeasy Serum/Plazma izolasyon kiti (Qiagen, Germany) kullanılmıştır. miRNA ekstraksiyonu üretici firmanın önerilerine göre aşağıdaki gibi yapılmıştır.

1. Tüplere 200 µl serum örnekleri eklendi ve üzerine 1000 µl Qiazol Lysis Reagent eklenerek vortekslendi
2. Karışım oda sıcaklığında (15-25°C) 5 dk bekletildi.
3. Tüplere 3.5 µl miRNeasy Serum/Plasma Spike- In Kontrol eklenerek hızlı bir şekilde pipetaj yapıldı.
4. Tüplere 200 µl kloroform eklendi ve 15 sn hızlı bir şekilde vortekslendi.
5. Oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildi ve ardından +4 °C'de 13400 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Örnekler oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.

6. Üst sulu fazdan 600 µl alınarak yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. 900 µl %100'lük etanol eklenerek pipetaj yapıldı.
7. Toplama tüplerinde bulunan RNeasy MinElute Spin kolon üzerine karışımdan 700 µl örnek eklenerek 10000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
8. Kolon üzerine örnekten geriye kalan kısım eklenerek oda sıcaklığında 10000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
9. Kolon üzerine 700 µl buffer RWT eklendi ve oda sıcaklığında 10000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
10. Kolon üzerine 500 µl buffer RPE eklendi ve oda sıcaklığında 10000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
11. Kolon üzerine 500 µl % 80'lik etanol eklendi. Kapağı kapatıldıktan sonra 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
13. Kolon yeni bir 2 ml'lik tüplere yetiştirildi ve kapağı açık bir şekilde 13400 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
14. Kolon yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 14 µL RNase-free water eklenerek miRNA'yı ayrıştırmak için 13400 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen miRNA'lar -80 °C'de saklamak üzere kaldırıldı.

3.2. Parafinli Doku Örneklerinin Deparafinizasyonu

Parafin bloklarından alınan 4 adet 5 µm kalınlığında kesilmiş ince kesitler ksilen metodu ile deparafinizasyon yapılarak dokular parafinden uzaklaştırılmıştır.

Deparafinizasyon işlemi:

1. Tüp içerisinde doku örneklerin üzerine 1 ml ksilen eklenerek parafinin çözünmesi için 15 saniye vortekslendi, ardından 55°C'de 5 dk ısı bloğunda inkübe edildi.
2. Tüpler 1 dk 13400 rpm'de santrifüj edildi. Ksilen içeren süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
3. Parafinin tamamı çözünene kadar 1.ve 2. basamak tekrarlandı.
4. Tüp içerisine 500 µl ksilen eklenerek vortekslendi. Ardından 55°C'de 5 dk ısı bloğunda inkübe edilerek üzerine 500 µl %100'lük etanol eklendi.

5. Tüpler 13400 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Pellete zarar vermeden süpernatant uzaklaştırıldı.
6. Tüp içerisine 1 ml etanol eklenerek vortekslendi Ardından 13400 rpm’de 1 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
7. Tüp içerisine 1 ml etanol eklenerek vortekslendi Ardından 13400 rpm’de 1 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
8. Son olarak ethanol süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpler kalan etanolün buharlaşması için açık tutuldu (5dk kuru-hava).

3.3. Doku Örneklerinden miRNA İzolasyonu

Deparafinizasyon yöntemi ile parafinden uzaklaştırılan doku örneklerinden miRNA eldesi için miRNeasy Mini Kiti (Qiagen, Germany) kullanılmıştır. miRNA ekstraksiyonu üretici firmanın önerilerine göre aşağıdaki gibi yapılmıştır.

1. Parafinden uzaklaştırılan doku örneklerinin üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent eklenerek hızlı bir şekilde vortekslendi
2. Tüpler oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
3. Dokuların parçalanması için tüplerin içerisine cam boncuklar eklenerek Tissue Lyser LT cihazında (Qiagen, Germany) 20 Hz’de 5 dakika homojenizasyonu sağlandı.
4. Tüplere 140 µl kloroform eklenerek 15 sn hızlı bir şekilde vortekslendi.
5. Oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildikten sonra + 4°C’de 13400 rpm’de 15 dk santrifüj edildi.
6. Üst sulu fazdan 350 µl alınarak yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. 525 µl %100 etanol eklenerek pipetaj yapıldı.
7. Toplama tüplerinde bulunan RNeasy MinElute Spin kolon üzerine karışımdan 700 µl örnek eklenerek 10000 rpm’de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
8. Kolon üzerine örnekten geriye kalan kısım eklenerek oda sıcaklığında 10000 rpm’de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
9. Kolon üzerine 700 µl Buffer RWT eklenerek 10000’de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.

10. Kolon üzerine 500 µl buffer RPE eklenerek 10000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
11. Kolon üzerine 500 µl buffer RPE eklenerek 10000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
12. Kolon yeni bir 2 ml’lik tüplere yetiştirildi ve kapağı açık bir şekilde 13400 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
13. Kolon yeni bir 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 30 µL RNase-free water eklenerek miRNA’yı ayrıştırmak için 13400 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
14. Daha yüksek miRNA eldesi için 13. basamakta elde edilen miRNA elüsyonunu tekrar kolon içerisine eklenerek 13400 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen miRNA’lar -80 °C’de saklamak üzere kaldırıldı.

3.4. miRNA’dan Komplementar DNA (cDNA) Eldesi

miRNA’dan cDNA eldesi için miScript Reverse Transcription (RT) Kit II (Qiagen, Germany) kullanılarak sentezlenmiştir. Her bir örnek için tüp içerisine 4 µl 5x miScript HiSpec tamponu, 2 µl 10x miScript Nükleik asit karışımı, 2 µl miScript Reverse Transcriptase Mix ve 12 µl kalıp RNA ile toplam 20 µl RT karışımı hazırlandı. Karışım MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad) cihazında 37 °C’de 60 dk 95 °C’de 5 dk olan tepkime koşullarına göre RT-PCR (Reverse-Transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) yapıldı. Sonrasında cDNA miktarların üzerine 90 µl Rnase free water eklenerek sulandırıldı. qRT-PCR testi için 5 µl cDNA kullanıldı.

3.5. miRNA’ların RT-PCR ile Kantitasyonu

miRNA’ların qRT-PCR testi için miScript SYBR Green PCR kiti (Qiagen, Germany) kullanılarak hazırlanmıştır. qRT-PCR tepkimesinde kullanılan reaksiyonlar aşağıda gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Real-time PCR bileşenleri

Reaksiyon	Miktar
2x QuantiTect SYBR Green PCR Mix	10 µl
10x miScript Universal Primer	2 µl
10x miScriptPrimerAssay	2 µl
Rnease free water	1 µl
Kalıp cDNA	5 µl
Toplam	20 µl

Her bir PCR mix için miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-182-5p, miR-221-5p, miR-223-5p primerleri ve housekeeping gen olarak SNORD61 primeri de kullanılarak ayrı tüplere PCR mixinden 15 µl dağıtıldı. Tüp içerisine 5 µl cDNA eklenerek miRNA ekspresyon seviyelerini tespit etmek amacıyla Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany) cihazı kullanıldı. Amplifikasyon için tablo 2’de verilen ısı döngüsü programında çalıştırıldı.

Tablo 2. Real-time PCR sıcaklık döngüleri

Adım	Siklus	Sıcaklık	Zaman
1	1	95 °C	15 dakika
2	40	95 °C	15 saniye
		58 °C	30 saniye
		72 °C	30 saniye

3.6. Verilerin Analizi

Kronik HBV gelişen ve HBV ile ilişkili HCC hastaların kontrol grubuna göre miRNA ekspresyon profillerinde meydana gelecek değişiklikler hesaplanmıştır. RT-PCR analizinde verilen Ct değerleri formüle edilerek Excel programına aktarılmıştır. SNORD61 referans miRNA kabul edilerek Ct değerleri belirlenmiştir. Sonrasında normal olgulara göre normalizasyonu yapılarak kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analizi ile

hesaplanmıştır. Tüm analizler ‘‘QIAGEN GeneGlobe Data Analysis Center’’ web sitesi üzerinden yapılmıştır.

ROC eğrisi birden çok test etkinliğinin karşılaştırılmasında bu testlerin ayırt etme gücünün tespitinde, tanı etkinliklerinin karşılaştırılmasında ve pozitif eşik değerlerinin saptanmasında kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. ROC eğrisinin dikey ekseninde değişik eşik değerleri tanımlayan doğru pozitiflik (duyarlılık), yatay ekseninde ise yanlış pozitiflik (1-özgüllük) oranları bulunur. Tanı testinin yeterliliği ROC eğrisinin altındaki alan olan AUC (Area Under Curve) değeri ile belirlenir. ROC analizi değerlendirilmesinde SPSS (IBM Statistics Versiyon 20.0) programı kullanıldı ve istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 35 KHB'li, 35 HBV ile ilişkili HCC'li ve 30 sağlıklı bireylerden alınan serum ve doku örneklerinden potansiyel biomarker olan miRNA'ları tespit etmek amacıyla qRT-PCR testi ile çalışılmıştır.

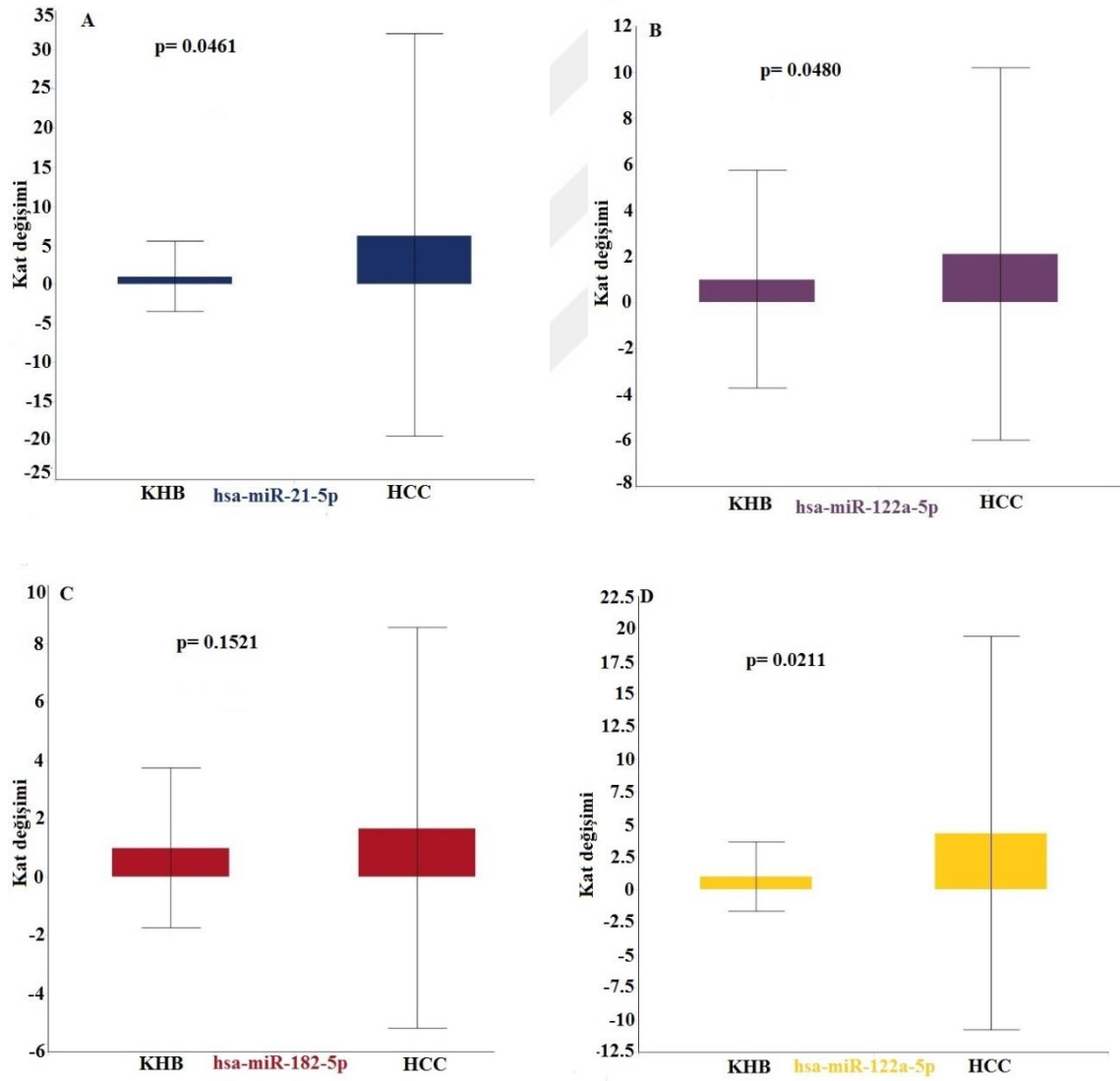
KHB ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımı ve yaş ortalaması birbirine yakın iken HCC grubunda cinsiyet dağılımında büyük çoğunlukla erkek hastalar oluşturmakta ve yaş ortalaması ise oldukça yüksek görülmüştür. KHB, HCC ve kontrol grubuna ait cinsiyet dağılımı, yaş ortalaması, serolojik, biyokimyasal, hormon ve histolojik bulguları Tablo 3'de özetlenmiştir.

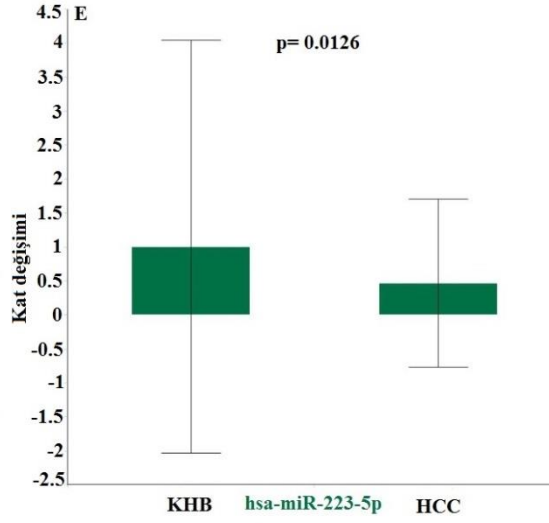
Tablo 3. Hastalara ve kontrol grubuna ait cinsiyet dağılımı, yaş ortalaması, serolojik, biyokimyasal, hormon ve histolojik bulguları.

	KHB	HCC	Kontrol Grubu
Hasta sayısı	35	35	30
Erkek	16	30	17
Kadın	19	5	13
Yaş ortalaması	35	64.7	38
HBsAg ortalaması (IU/mL)	5038	4008	-
HBV DNA ortalaması (IU/mL)	$1,2 \times 10^7$	81.320	-
ALT ortalaması (IU/L)	33.6	59.7	-
AST ortalaması (IU/L)	29.1	67.6	-
AFP (IU/L) ≤ 200	-	17	-
AFP (IU/L) ≥ 200	-	18	-
Fibroz skoru			
1	9	-	-
2	7	-	-
3	18	-	-
4	1	-	-

HCC, KHB ve kontrol grubu arasında yapılan çalışmada miR-21-5p, miR-122a-5p, miR182-5p, miR-221-5p, miR-223-5p ve housekeeping gen olarak kullanılan SNORD61'in ekspresyon seviyeleri serumda karşılaştırılmıştır.

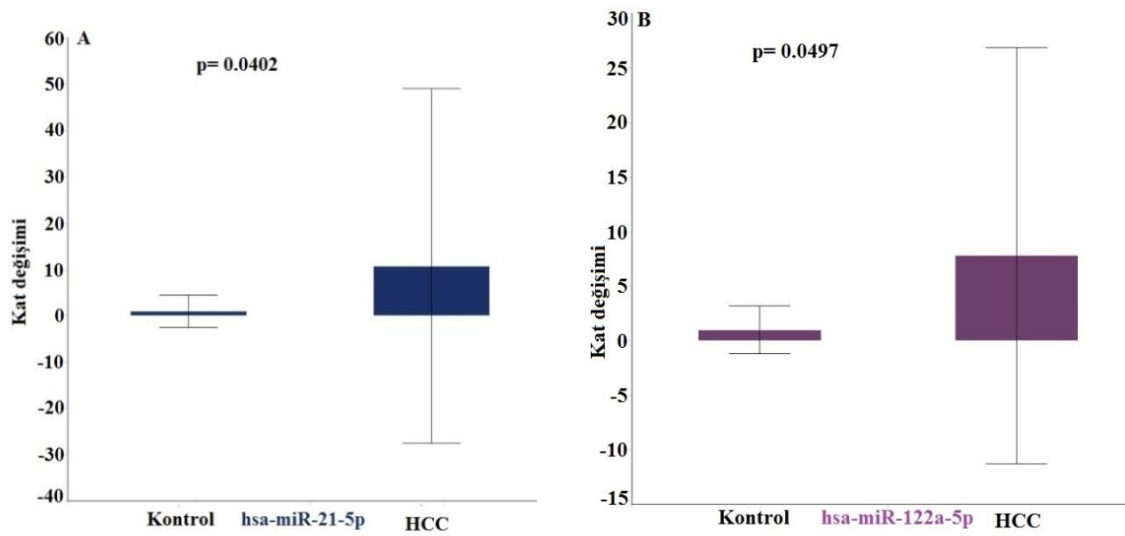
HCC'nin KHB'ye göre karşılaştırıldığında (Şekil 5) miR-21-5p (6.2 kat), miR-122a-5p (2.1 kat), miR-221-5p'nin (4.3 kat) serum ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde upregüle iken ($p < 0.05$) miR-223-5p'nin serum ekspresyon seviyesi (2.2 kat) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde downregüle görülmüştür ($p < 0.05$). miR-182-5p'nin serum ekspresyon seviyesi 1.6 kat artmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

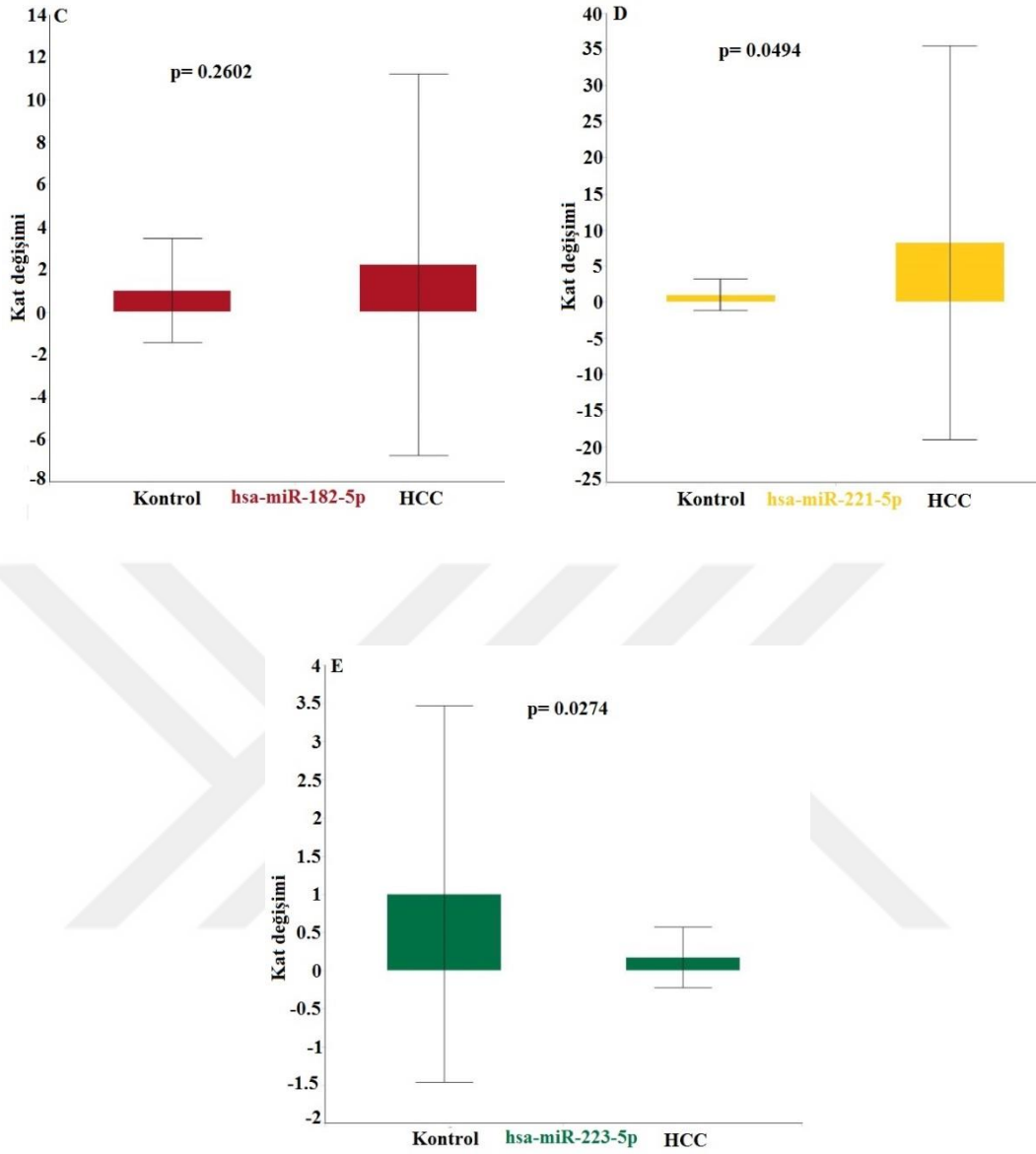




Şekil 5. HCC'nin KHB'ye göre serum miRNA'ların kat değişimleri ve p değeri. A. hsa-miR-21-5p, B. hsa-miR-122a-5p, C. hsa-miR-182-5p, D. hsa-miR-221-5p ve E. hsa-miR-223-5p.

HCC'nin kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında (Şekil 6) miR-21-5p (10.7 kat), miR-122a-5p (7.7 kat), miR-221-5p'nin (8.1 kat) serum ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde upregüle iken ($p < 0.05$) miR-223-5p'nin serum ekspresyon seviyesi (5.8 kat) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde downregüle tespit edilmiştir ($p < 0.05$). miR-182-5p'nin serum ekspresyon seviyesi 2.2 kat artmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0.05$).



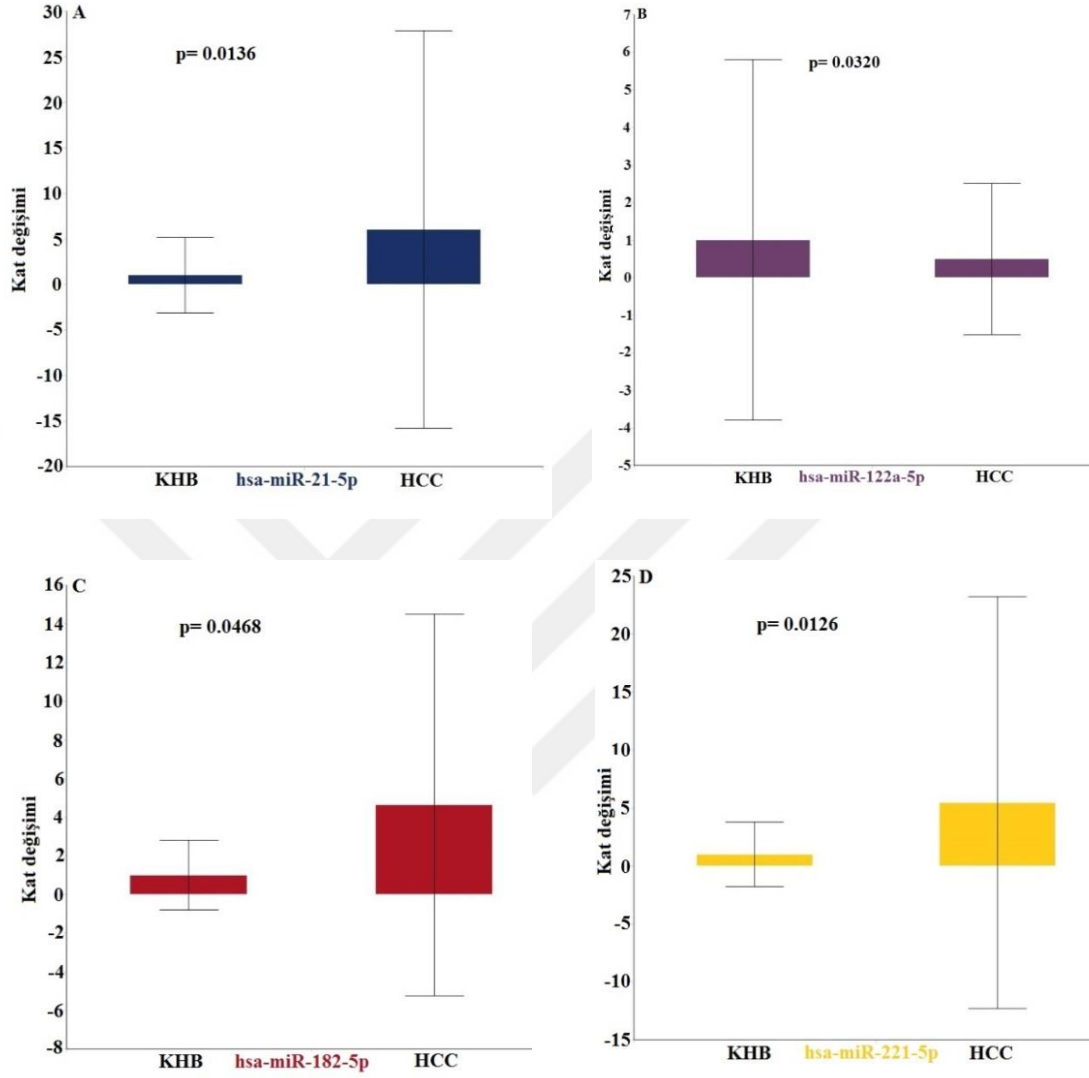


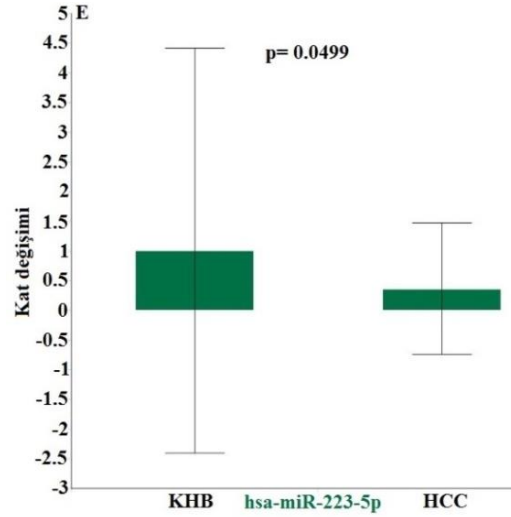
Şekil 6. HCC'nin kontrol grubuna göre serum miRNA'ların kat değişimleri ve p değeri. A. hsa-miR-21-5p, B. hsa-miR-122a-5p, C. hsa-miR-182-5p, D. hsa-miR-221-5p ve E. hsa-miR-223-5p.

HCC, KHB ve kontrol grubu arasında yapılan çalışmada miR-21-5p, miR-122a-5p, miR182-5p, miR-221-5p, miR-223-5p ve housekeeping gen olarak kullanılan SNORD61'in ekspresyon seviyeleri dokuda karşılaştırılmıştır.

HCC'nin KHB'ye göre karşılaştırıldığında (Şekil 7) miR-21-5p (6 kat), miR-182-5p (4.6 kat) ve miR-221-5p'nin (5.4 kat) doku ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde upregüle iken ($p < 0.05$) miR-122a-5p (2 kat) ve miR-223-

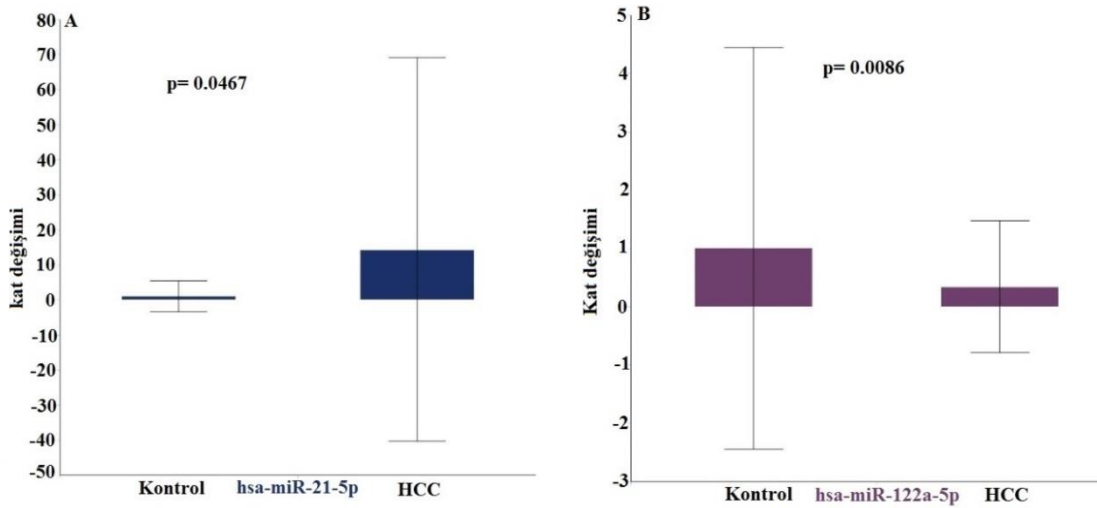
5p'nin (2.8 kat) doku ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde downregüle görülmüştür ($p < 0.05$).

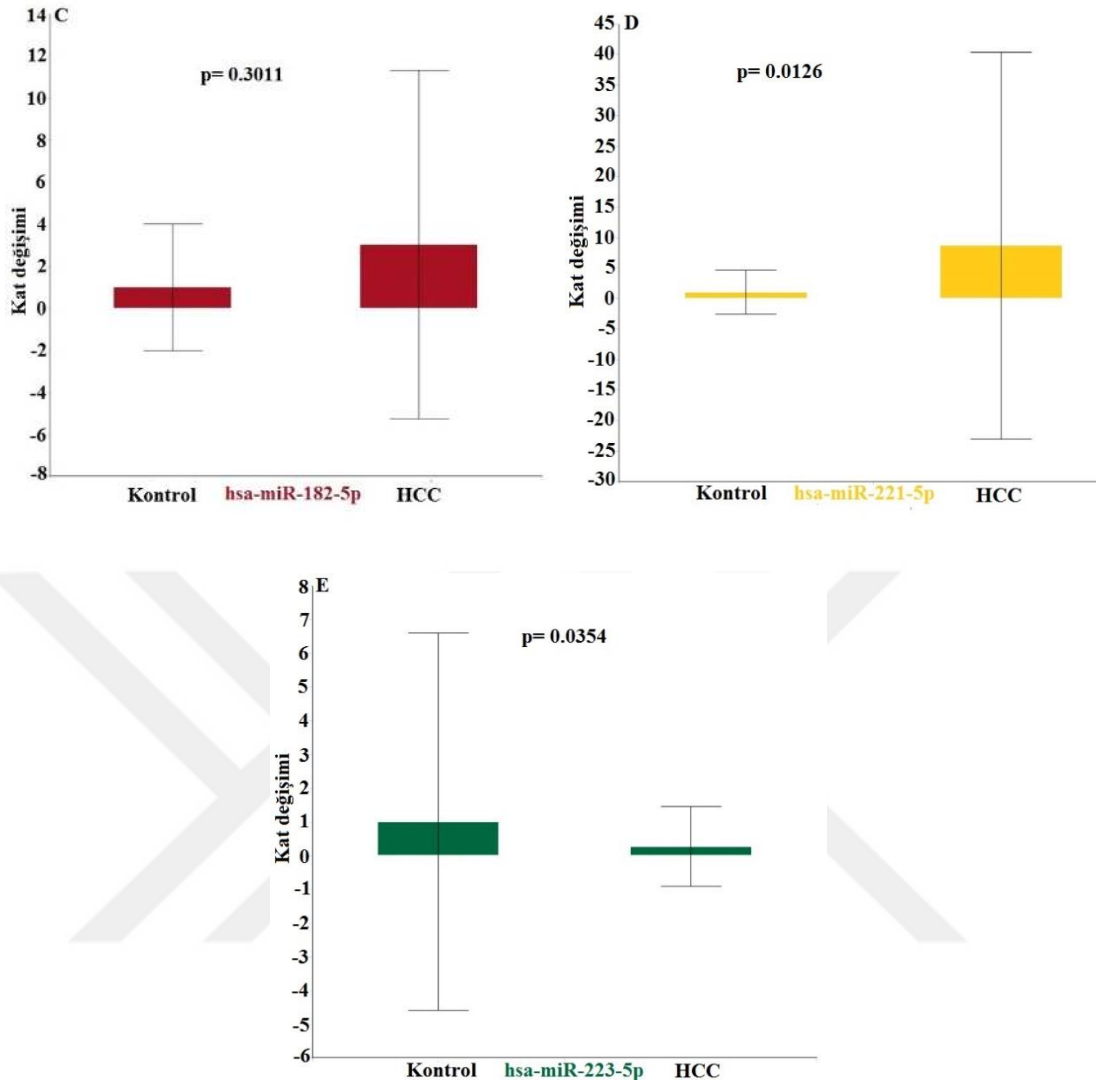




Şekil 7. HCC'nin KHB grubuna göre doku miRNA'ların kat değişimleri ve p değeri. A. hsa-miR-21-5p, B. hsa-miR-122a-5p, C. hsa-miR-182-5p, D. hsa-miR-221-5p ve E. hsa-miR-223-5p.

HCC'nin kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında (Şekil 8) miR-21-5p (14.3 kat) ve miR-221-5p'nin (8.6 kat) doku ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde upregüle iken ($p < 0.05$) miR-122a-5p (2.9 kat) ve miR-223-5p'nin (3.7 kat) doku ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde downregüle tespit edilmiştir ($p < 0.05$). miR-182-5p doku ekspresyon seviyesi 3 kat artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0.005$).

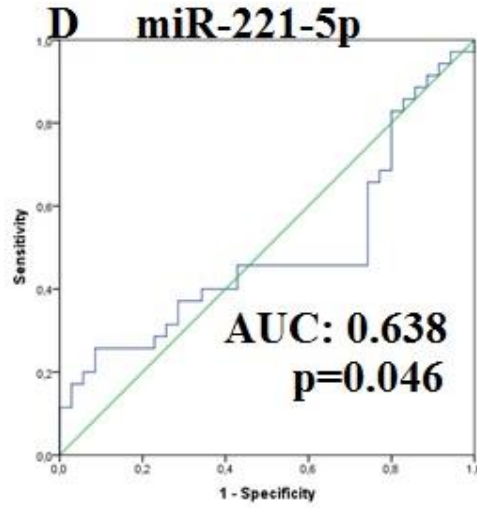
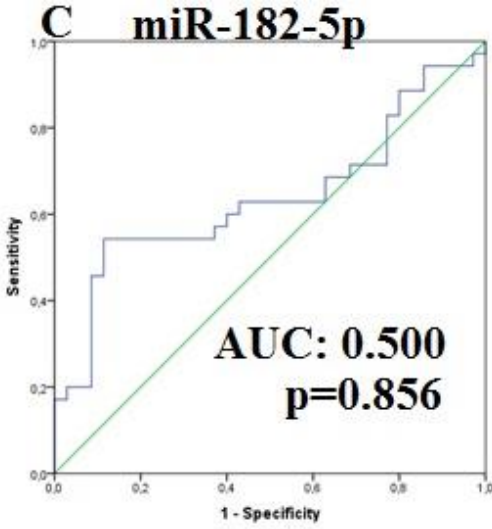
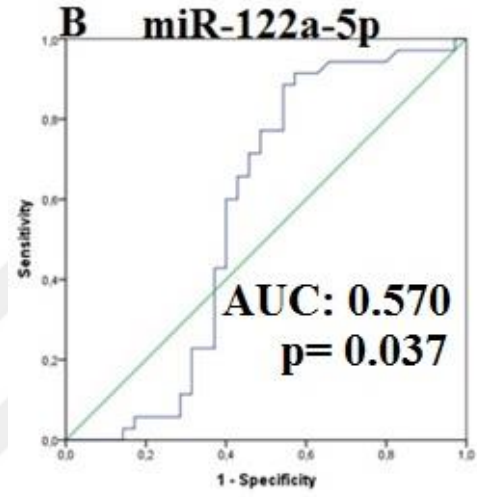
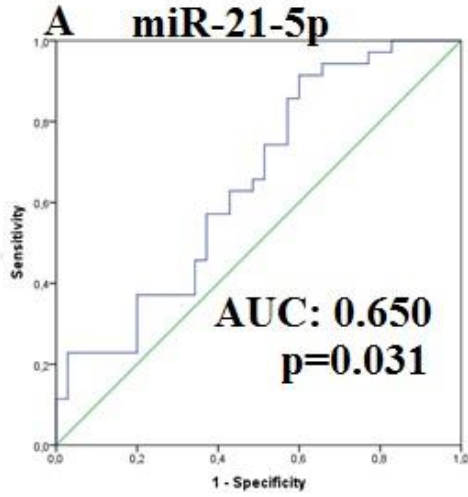


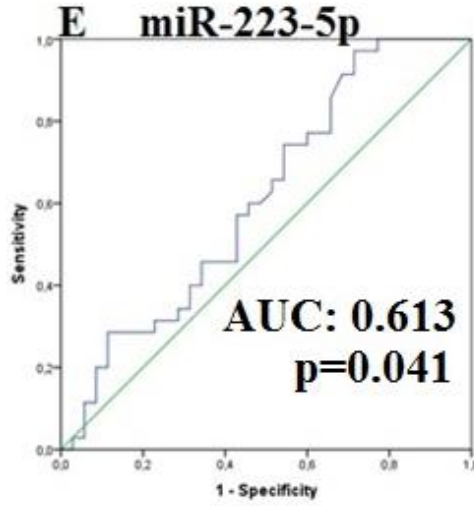


Şekil 8. HCC'nin kontrol grubuna göre doku miRNA'ların kat değişimleri ve p değeri. A. hsa-miR-21-5p, B. hsa-miR-122a-5p, C. hsa-miR-182-5p, D. hsa-miR-221-5p ve E. hsa-miR-223-5p.

HCC'li hastaların KHB'li hastalara göre serum ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde tespit ettiğimiz miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-221-5p ve miR-223-5p'nin biyomarker olarak duyarlılık ve özgüllük değerleri ROC analizi ile belirlenmiştir. Serum ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan miR-182-5p'nin ROC analizi çalışmaya dahil edilmiştir. miR-21-5p'nin ROC analizi sonucunda AUC değeri 0.650, miR-122a-5p'nin AUC değeri 0.570, miR-182-5p'nin AUC değeri 0.5, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.638 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.613 olarak tespit edilmiştir (Şekil 9). ROC eğrisi altında kalan alanı AUC değeri 0.5'den büyük çıktığı durumda o miRNA'ların iki grup arasında istatistiksel olarak ayrımı iyi sağladığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda ROC eğrisi altında kalan alana

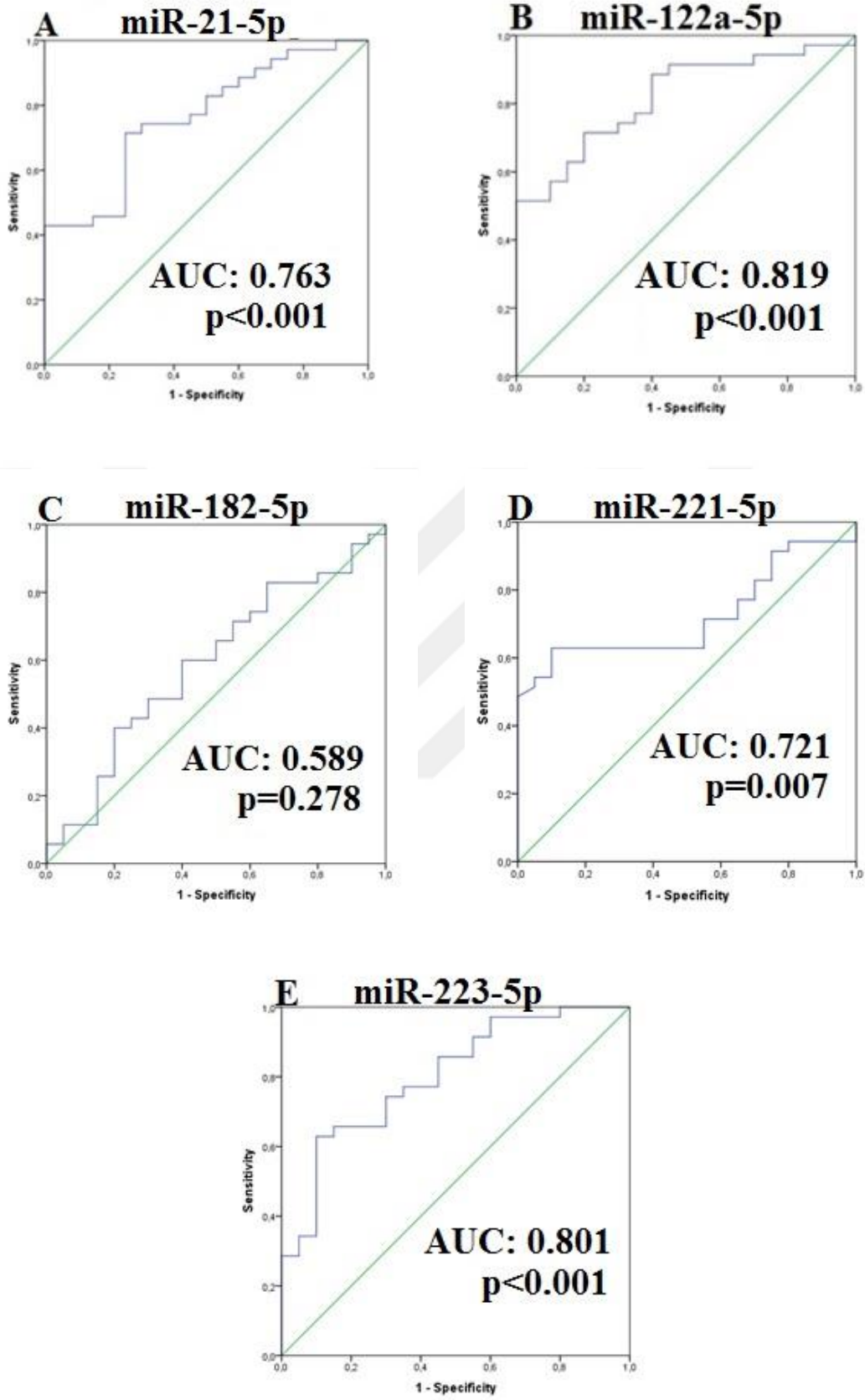
göre iki grup arasında ayrımı iyi yapabilen ve ROC analiz sonucu istatistiksel olarak anlamlı olan miRNA'lar; miR-21-5p ($p=0.031$), miR-122a-5p ($p=0.037$), miR-221-5p ($p=0.046$) ve miR-223-5p ($p=0.041$) şeklinde bulunmuştur. miR-182-5p'nin AUC değeri 0.5'den büyük olmasına rağmen ROC analizi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.856$).





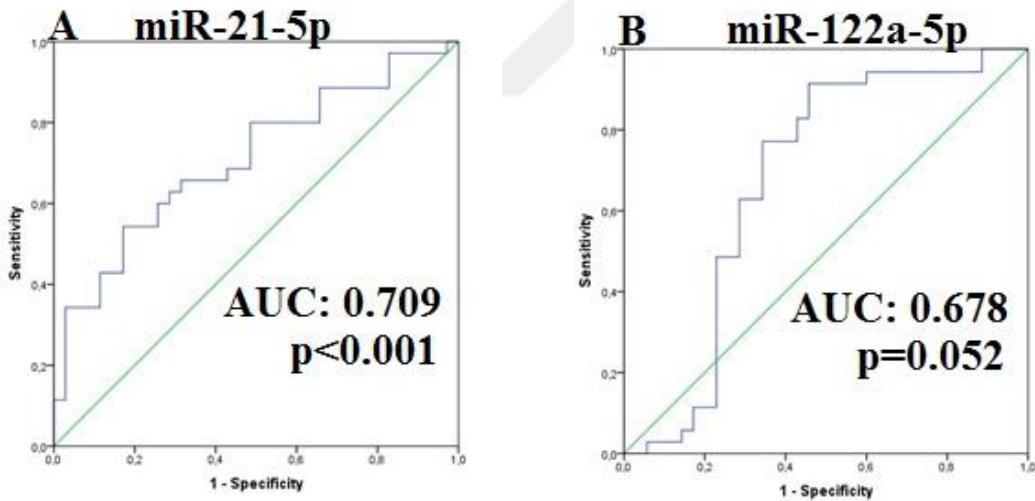
Şekil 9. HCC hastaların KHB'li hastalara göre ROC analizi. A. miR-21-5p, B. miR-122a-5p, C. miR-182-5p, D. miR-221-5p ve E. miR-223-5p.

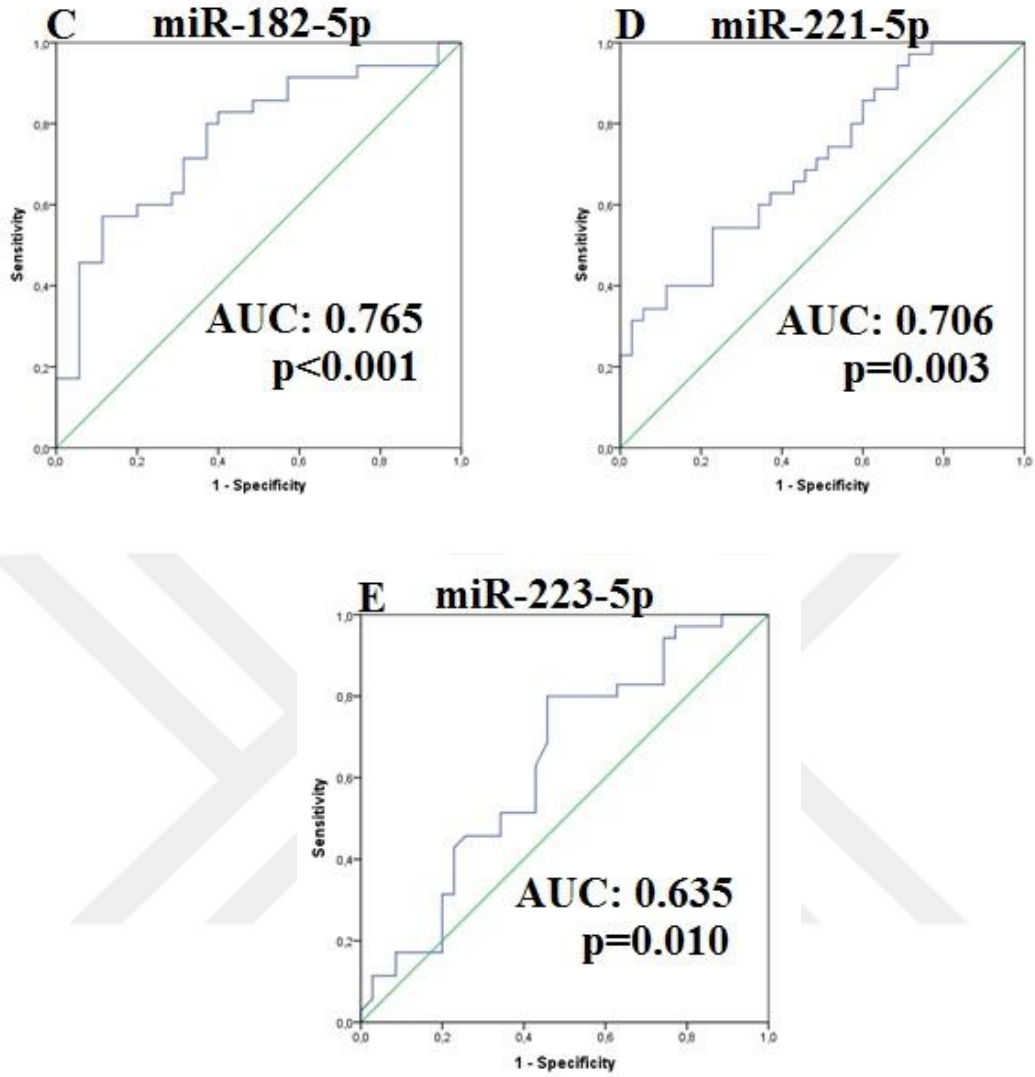
HCC'li hastaların kontrol grubuna serum ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde tespit ettiğimiz miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-221-5p ve miR-223-5p'nin biyomarker olarak duyarlılık ve özgüllük değerleri ROC analizi ile belirlenmiştir. Serum ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan miR-182-5p'nin ROC analizi çalışmaya eklenmiştir. miR-21-5p'nin ROC analizi sonucunda AUC değeri 0.763, miR-122a-5p'nin AUC değeri 0.819, miR-182-5p'nin AUC değeri 0.589, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.721 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.801 olarak tespit edilmiştir (Şekil 10). ROC eğrisi altında kalan alanı AUC değeri 0.5'den büyük çıktığı durumda o miRNA'ların iki grup arasında istatistiksel olarak ayrımı iyi sağladığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda ROC eğrisi altında kalan alana göre iki grup arasında ayrımı iyi yapabilen miRNA'ların sırasıyla; miR-122a-5p ($p<0.001$), miR-223-5p ($p<0.001$), miR-21-5p ($p<0.001$) ve miR-221-5p ($p=0.007$) şeklinde bulunmuştur. miR-182-5p AUC değeri 0.5'den büyük olmasına rağmen miR-182-5p'nin ROC analizi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.278$).



Şekil 10. HCC hastaların kotrol grubuna göre ROC analizi. A. miR-21-5p, B. miR-122a-5p, C. miR-182-5p, D. miR-221-5p ve E. miR-223-5p.

HCC'li hastaların KHB'li hastalara göre doku ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde tespit ettiğimiz miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-182-5p, miR-221-5p ve miR-223-5p'lerin biyomarker olarak duyarlılık ve özgüllük değerleri ROC analiz ile belirlenmiştir. miR-21-5p'nin ROC analizi sonucunda AUC değeri 0.709, miR-122a-5p AUC değeri 0.678, miR-182-5p AUC değeri 0.765, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.706 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.635 olarak tespit edilmiştir (Şekil 11). ROC eğrisi altında kalan alanı AUC değeri 0.5'den büyük çıktığı durumda o miRNA'ların iki grup arasında istatistiksel olarak ayrımı iyi sağladığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda ROC eğrisi altında kalan alana göre iki grup arasında ayrımı iyi yapabilen ve istatistiksel olarak anlamlı olan miRNA'ların sırasıyla; miR-21-5p ($p<0.001$), miR-182-5p ($p<0.001$), miR-221-5p ($p=0.003$), miR-122a-5p ($p=0.052$) ve miR-223-5p ($p=0.010$) şeklinde bulunmuştur.

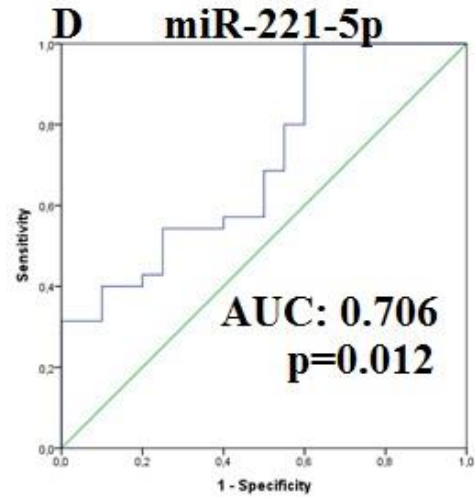
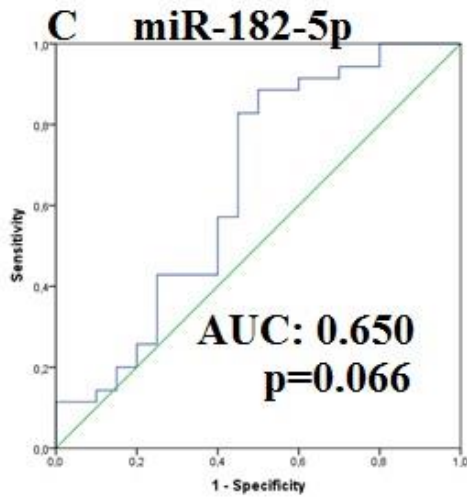
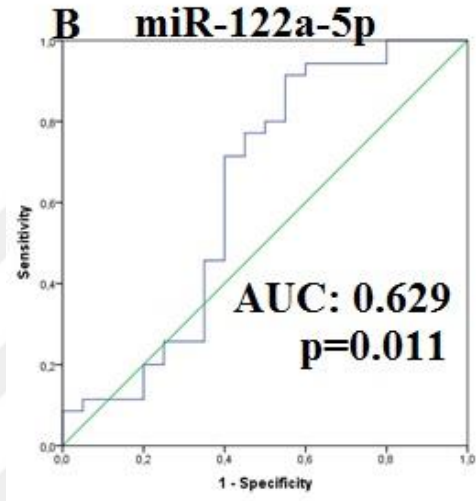
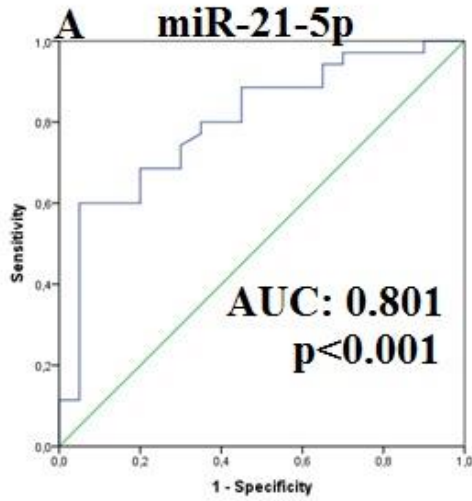


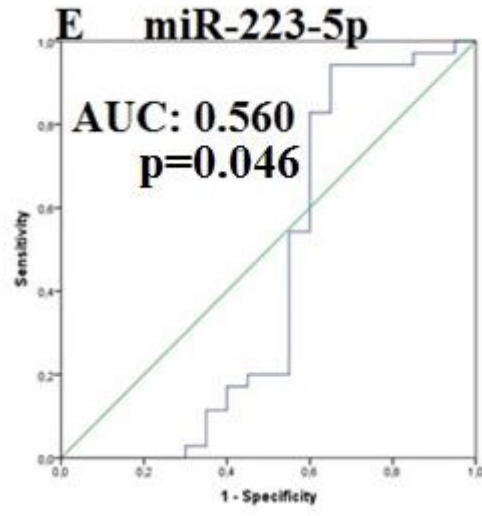


Şekil 11. HCC'li hastaların KHB'li hastalara göre ROC analizi. A. miR-21-5p, B. miR-122a-5p, C. miR-182-5p, D. miR-221-5p ve E. miR-223-5p.

HCC'li hastaların kontrol grubuna göre doku ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde tespit ettiğimiz miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-221-5p ve miR-223-5p'lerin biyomarker olarak duyarlılık ve özgüllük değerleri ROC analizi ile belirlenmiştir. miR-182-5p'nin doku ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen ROC analizi çalışmaya eklenmiştir. miR-21-5p'nin ROC analizi sonucunda AUC değeri 0.801, miR-122a-5p AUC değeri 0.629, miR-182-5p AUC değeri 0.650, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.706 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.560 olarak tespit edilmiştir (Şekil 12). ROC eğrisi altında kalan alanı AUC değeri 0.5'den büyük çıktığı durumda o miRNA'ların iki grup arasında istatistiksel olarak

ayrımı iyi sağladığı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda ROC eğrisi altında kalan alana göre iki grup arasında ayrımı iyi yapabilen ve istatistiksel olarak anlamlı olan miRNA'ların sırasıyla; miR-21-5p ($p<0.001$), miR-221-5p ($p=0.012$), miR-122a-5p ($p=0.011$) ve miR-223-5p ($p=0.046$) şeklinde bulunmuştur. miR-182-5p'nin AUC değeri 0.5'den büyük olmasına rağmen ROC analizi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.066$).





Şekil 12. HCC'li hastaların kontrol grubuna göre ROC analizi. A. miR-21-5p, B. miR-122a-5p, C. miR-182-5p, D. miR-221-5p ve E. miR-223-5p.

5. TARTIŞMA

HCC yaşamı tehdit eden en yaygın beş kanser olup dünya çapında ikinci ölüm sebebidir¹²⁷. 2018 itibarıyla, sırasıyla 554.400 ve 228.100 yeni vaka ile erkeklerde beşinci, kadınlarda dokuzuncu en yaygın kanser nedeni olmuştur. Karaciğer kanseri tahmini ölüm oranıyla erkeklerde ikinci sırada (521.000) ve kadınlarda altıncı sıradadır (224.500)¹⁴³. HCC gelişimi ile ilişkili risk faktörleri aşırı alkol tüketimi, hepatit B/C virus enfeksiyonu, aflatoksine maruz kalma ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), tip 2 diyabet ve cinsiyettir⁷⁶. HBV enfeksiyonu dünyada vakaların yarısından fazlasını ve özellikle Güneydoğu Asya ve Sahra altı Afrika'daki vakaların %80'ini veya daha fazlasını oluşturan HCC'nin gelişiminde en önemli role sahiptir¹⁴⁴. Her ne kadar birçok çalışmada HBV'nin kronik enfeksiyonu ile HCC gelişimi arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiş olsa da HBV'un neden olduğu hepatokarsinogenezin altında yatan moleküler mekanizmalar hala belirsizliğin korumaktadır. Ancak HBV'un hem cis etkili onkogenler hem de tümör baskılayıcı genler ve trans etkili hücresel genler yoluyla HCC'yi destekleyebileceği öne sürülmüştür¹⁴⁵.

miRNA'lar hedef mRNA'ların 3' çevrilmemiş bölgesi (UTR) ile diziye spesifik etkileşimler yoluyla mRNA bozulmasını teşvik ederek veya protein translasyonunu baskılayarak gen ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen 20-25 nükleotid uzunluğunda endojen küçük kodlayıcı olmayan RNAlardır. miRNA'ların proliferasyon, apoptoz, çoğalma ve farklılaşma gibi çeşitli fizyolojik işlemlerde önemli rol oynadığı bilinmektedir. miRNA ekspresyonunun düzensizliği kanser dahil birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir¹⁴⁶. miRNA ekspresyonunun düzensizliği tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesine eşlik ettiği ve onkogenlerin anormal aktivasyonuna da katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. miRNA'lar ayrıca karaciğer hücrelerinde HBV girişi, replikasyonuna ve hücre döngüsü kontrol noktaları, apoptoz ve hücre göçünü belirleme gibi diğer birçok temel hücresel işlemlere etki edebilir. miRNA'lar genellikle HCC'de serbest bırakılır ve bazı spesifik miRNA'lar HCC'nin patolojik özellikleri ile ilişkilidir. Son zamanlarda miRNA'ların HCC ilerlemesinde kritik rol oynadıkları ve çok sayıda spesifik mRNA'yı hedefleyerek tümör hücre proliferasyonuna, apoptotik hücre ölümünden ve metastazından kaçınmaya doğrudan katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

miRNA'lar hedeflediği mRNA'nın sinyal yollarına göre onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak işlev görebilir¹²⁷.

miRNA'lar serum ve plazma dahil olmak üzere çeşitli vücut sıvılarında, normal karaciğer ve karaciğer kanseri dokularında preneoplastik ve neoplastik lezyonlar arasında bulunur. Ayrıca miRNA'lar düşük pH ve RNAaz'a direnç gibi aşırı koşullar altında önemli stabilite gösterdiğinden dolayı alternatif noninvaziv biomarker olarak da kabul edilir¹⁴⁷. miRNA'lar sadece kan serumunda değil aynı zamanda karaciğer dokularında da eksprese edilir. HBV ile ilişkili HCC tipik olarak KHB enfeksiyonundan başlayarak karaciğer sirozu ve düşük veya yüksek dereceli displastik nodül ve son olarak HCC'ye doğru aşamalı bir şekilde gelişir. Karaciğer dokularındaki bazı miRNA'ların benzer bir şekilde düzensiz olduğu hastalık gelişim seviyesine göre değişen ekspresyonu tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmada miRNA'ların yalnızca tanısal biomarker olarak değil aynı zamanda kanser için prognostik faktörler olarak da uygulanabileceğini göstermiştir¹⁴⁸.

miR-21 tümör baskılayıcı genin etkisini inhibe eden ve tümör hücresi büyümesi, invazyon ve metastazı teşvik eden bir onko miRNA olarak kabul edilir. Nekrotizan enflamatuar aktivitenin bir özelliği olan serum miR-21 seviyelerinin HCC malignitesi olan hastaların tümör dokularında upregüle düzenlediği bildirilmiştir. Bu durum fosfataz tensin homologları (PTEN) ve programlanmış hücre ölümü 4 (PDCD4) gibi bazı tümör baskılayıcıların başarısız olmasına yol açarken fosfo-c-Jun, matris metaloproteinazlarının (MMP-2 ve MMP9) üretimini uyarmasına sebep olur. Ayrıca miR-21 ekspresyonu sirozun ilerlemesi, lezyon sayısının artması ve genişlemiş tümör ile birlikte önemli ölçüde artmıştır¹⁴⁹.

HBV ile ilişkili HCC'de potansiyel biomarker olan miR-21 ile ilgili yapılan araştırmalardan Zhang ve ark¹⁵⁰. Çin'de, 2016 yılında yaptıkları çalışmada 65 HCC'li, siroz ve HBV olarak ayrılmış gruplarda RT-PCR yöntemi ile serum miR-21, miR-22 ve miR-153 ekspresyon seviyelerini tespit etmiştir. Çalışma sonucunda serum miR-21, miR-22 ve miR-153 ekspresyon seviyeleri HCC hastalarında siroz ve HBV gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. HCC'li hastaların HBV ve kontrol grubuna göre ROC analizi değerlendirilmesinde miR-21'in AUC değeri 0.862 olarak

görülmüştür. Sonuç olarak miR-21, miR-22 ve miR-153 HCC'li hastalar için yeni tanısal biomarker olarak tanımlanabileceğini göstermiştir.

Yoon ve ark¹⁵¹. Kore'de, 2018 yılında yaptığı çalışmada 93 HCC hastasına ait doku ve tümör olmayan doku örneklerinden miR-21 ve miR-31'in ekspresyon seviyeleri analiz etmiştir. miR-21 ekspresyonu HCC dokularında tümör olmayan dokulara göre anlamlı şekilde upregüle olmuştur. Sonuç olarak doku miR-21'in yüksek ekspresyonu HCC prognozu için bir biomarker olabileceğini göstermiştir.

Guo ve ark¹⁵². Çin'de, 2016 yılında HCC'li hastalar ve diğer kontroller için serum miR-21'in tanısal etkinliğini yeni biomarker olarak değerlendirmeyi planladığı çalışmayı 2 adımda gerçekleştirmiştir. 1. adımda 40 HCC hastasına ve sağlıklı bireylere ait doku örneklerinde qRT-PCR metodu ile miR-21 ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. 2. adımda ise 175 HCC'li, 64 KHB'li, 78 karaciğer sirozu ve 136 sağlıklı bireylerden alınan serum örneklerinden aynı yöntem ile miR-21 ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Çalışmada miR-21'in serum ve doku seviyeleri HCC hastalarında sağlıklı kontrol gruba göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. AFP negatif HCC hastaların kontrol grubuna göre değerlendirilmesinde ROC analizi sonucunda AUC değeri 0.831 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca miR-21'in serum seviyeleri klinik evre ve metastaz ile anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur. Sonuç olarak miR-21'in AFP ile birlikte HCC'nin özellikle AFP negatif HCC'nin tanısını geliştirmeye yardımcı olabileceğini ve HCC'yi KHB ve karaciğer sirozundan ayırt edebileceğini göstermektedir.

Hepatokarsinogenez sürecinde yer alan miRNA'lar arasında en önemlisi olan miR-122 çeşitli biyomoleküler mekanizmalar yoluyla göç, hücre invazyon ve ilerleme süreçlerinde yer almaktadır. HCC gelişiminde miR-122'nin ekspresyon seviyesi doku azalırken serumda artmaktadır. miR-122'nin en önemli mekanizmalardan biri bcl-2 ailesinin bir anti apoptotik proteini olan bcl-w'nin inhibisyonuna sebep olmasıdır. miR-122'nin yüksek seviyeleri apoptozu teşvik ederek bcl-w'yi downregüle eder. miR-122'nin aşırı ekspresyonu siklin G1 seviyelerini düzenler ve p53'ü downregüle eder. Siklin G1'in artışı hücre büyümesini kolaylaştırır. Bu mekanizma tümör büyümesinde ve daha sonra tümör tekrar nüksetmesinde rol oynar. Düşük miR-122 seviyeleri göçü başlatan ADAM1 ve ADAM10 disintegrin ve metaloproteinazın aşırı ekspresyonunu teşvik eder. Bu eylemin kronik viral enfeksiyon ile ilişkili olduğu görülmektedir. Fan ve

ark¹⁵³. Düşük miR-122 seviyelerinin HBV replikasyonunu ve viral antijenin aşırı ekspresyonunu uyardığını ve ardından hücrel hasara, aşırı büyümeye ve hepatoselüler fibroze sebep olduğunu göstermiştir. Bu sebeple miR-122 HCC'nin tanısı, prognozu ve tedavisinde potansiyel bir biomarker olarak önemli bir rol göstermektedir¹⁴⁷.

HBV ile ilişkili HCC'de potansiyel biomarker olan miR-122 ile ilgili yapılan araştırmalardan Tan ve ark¹⁵⁴. Çin'de, 2013 yılında yaptığı bir çalışmada 261 HCC hastası, 233 siroz hastası ve 173 sağlıklı kontrol grubunda serum miRNA ekspresyonunu ilk olarak Illumina sekans ile yapılmış daha sonra seçilen miRNA'ların ekspresyonunu değerlendirmek için qRT PCR kullanılmıştır. Çalışma da 32 miRNA'nın 8'inde (hsa-miR-206, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-433-3p, hsa-miR-1228-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-192- 5p, and hsa-miR-26a-5p) HCC ve kontrol grupları arasında anlamlı şekilde farklı ekspresyon seviyeleri görülmüştür. HCC'li hastalarında siroz hastalarına göre ROC analizi değerlendirilmesinde miR-122'in AUC değeri 0.744 ve kontrol grubuna göre de AUC değeri 0.844 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak serum miRNA panelinin HCC'nin erken tanısı için önemli klinik değere sahip olduğunu göstermektedir.

Dai ve ark¹⁵⁵. Çin'de, 2017 yılında yaptığı bir çalışmada 50 HCC (42 HBV ile ilişkili), 50 iyi huylu lezyon ve 50 kontrol grubunda HCC ve diğer kanser türlerinin tanı ve prognozunda serum miR-122'nin ekspresyon seviyesini qRT-PCR ile belirlemiştir. Sonuçlar 3 grup arasında miR-122'nin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. HCC ve iyi huylu lezyon grubu sağlıklı grupla karşılaştırıldığında miR-122'nin ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış görülmüştür. Ayrıca iyi huylu lezyon grubu HCC grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek miR-122 ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. HCC'li hastaların siroz hastalarına göre ROC analizi değerlendirilmesinde miR-122'in AUC değeri 0.954 ve iyi huylu lezyon grubunda AUC değeri 0.677 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak miR-122'nin kanser tanı, prognostik değerlendirme ve hedefe yönelik tedavi için vazgeçilmez bir biomarker olabileceğini ortaya koymuştur.

Qiao ve ark¹⁵⁶. Çin'de, 2014 yılında yaptığı çalışmada 40 HBV ile ilişkili HCC hastaları ve sağlıklı bireylerden alınan doku örneklerinde miR-22 ve miR-122 ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. miR-22 ve miR-122

ekspresyon seviyeleri HCC hastalarında kontrol gruba göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. miR-22 ve miR-122 düzeyleri, hepsi bağımsız risk faktörleri olan tümör boyutu, lenf nodu metastazı, TNM evresi, patolojik tip, farklılaşma derecesi, karaciğer sirozu, AFP ve HBV DNA ile negatif korelasyon göstermiştir. Sonuç olarak miR-22 ve miR-122 HBV ile ilişkili HCC hastalarında downregüle bulunmuş ve tümör boyutu, lenf nodu metastazı, TNM evresi, patolojik tip, farklılaşma derecesi, karaciğer sirozu, AFP ve HBV DNA ile ilişkili olduğu görülmüştür.

HBV ile ilişkili HCC hastalarında potansiyel biomarker olan miR-122'in ülkemizde yapılan çalışmalardan Balkan ve ark¹⁵⁷. Gaziantep'de, 2016 yılında 29'u HBV ilişkili 42 HCC hastasında ve 45 kontrol grubunda miR-26, miR-122 ve miR-192 serum ekspresyon seviyelerini qRT PCR yöntemi ile tespit etmiştir. HCC grubundaki miR-122 serum ekspresyonu kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Ortalama miR-122 seviyesi kontrol grubunda 28.24 ng/μL, HCC grubunda 27.99 ng/μL olarak belirlenmiştir. Serum miR-122 seviyelerinde HCC ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Sonuç olarak miRNA'ların HCC'nin teşhisi ve izlenmesi için yakın gelecekte rutin olarak kullanılması muhtemeldir.

miR-183/96/182 kümesinin bir üyesi olan miR-182 HCC'de öncelikli bir miRNA olarak ortaya çıkarak çeşitli kanserlerle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte miR-182-5p'nin fonksiyonu karmaşıktır, çünkü farklı kanserler bağlamında onkogen veya tümör baskılayıcı olabilir. miR-182-5p yumurtalık kanseri, meme kanseri ve melanom'da onko-miR olarak tanımlanır ve glioblastomada tümör baskılayıcı olarak işlev görür. HCC'de miR-182-5p metastaz supresör 1 (MTSS1)'i hedef alarak HCC metastazına katkıda bulunur ve upregüle edilmiş miR-182-5p sisplatin ile muamele edilmiş HCC hücrelerinde ilacın tümörle indüklenen nükleer protein 1'i düzenleyerek ilaç direncini artırır. Bu sebeple miR-182-5p ekspresyon seviyesi HCC hastalarında tanısal ve prognostik değerde olabilir¹⁵⁸.

HBV ile ilişkili HCC'de potansiyel biomarker olan miR-182-5p ile ilgili yapılan araştırmalardan Riazalhosseini ve ark¹⁵⁹. Malezya'da, 2016 yılında KHB ve KHB ile ilişkili siroz veya HCC hastalarında serum miRNA ekspresyon profillerini karakterize etmiştir. Çalışmaya toplam 12 hasta dahil edilmiştir. miRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek için Affymetrix Gene Chip miRNA 3.0 Dizisi kullanılmıştır. miR-935, miR-

342, miR-339, miR-4508, miR-3615 ve miR-3200 ekspresyon seviyesi KHB hastalarında HCC hastalarına göre en az 2 kat upregüle iken miR-182 ve miR-4485 ekspresyon seviyesi downregüle olmuştur. Sonuç olarak miR-935, miR-342, miR-339, miR-4508, miR-3615, miR-3200, miR-182 ve miR-4485'in siroz ve HCC'ye ilerlemeyi tanımlamak için noninvaziv bimerkerler olarak kullanabileceğini göstermektedir.

Zhang ve ark¹⁶⁰. Çin'de, 2016 yılında 52 HCC ve 25 sağlıklı kontrol grubunda miR-182-5p, miR-363-3p ve miR-378a-3p ekspresyon seviyelerini qRT-PCR yöntemi ile tespit etmiştir. Çalışmada miRNA'ların CT değerleri referans gen RNU6 ile normalleştirilmiştir. miR- 182-5p, miR-363-3p ve miR-378a-3p HCC hastalarında sağlıklı kontrollerden anlamlı olarak daha yüksek ekspresyon seviyesi göstermiştir. HCC'li hastaların kontrol grubuna göre ROC analizi değerlendirilmesinde serum miR-182-5p'nin AUC değeri 0.802, miR-363-3p'nin AUC değeri 0.845 ve miR-378a-3p AUC değeri 0.880 olarak görülmüştür. Sonuç olarak serum miR-182-5p, miR-363-3p ve miR-378a-3p özellikle AFP-negatif hastalar için HCC tanısında potansiyel noninvaziv biomarker olarak uygulanabilir.

miR-221 sirozlu HCC vakalarının %71'ini oluşturan onkojenik miRNA'dır. miR-221'in hepatokarsinogenezde tanımlandığı mekanizmalar farklıdır. Kanser evresi ile ilişkisi gösterilmiş ve III-IV. aşamalarda seviyeleri daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu bulgu Karakatsanis ve ark.'nın gösterdiği gibi prognostik bir rol öne sürmektedir¹⁶¹. Li ve ark.'nın çalışmasında prognostik değeri bildirilmiş, miR-221'in serum seviyelerinin siroz ve kanser evresi ile korele olduğu gösterilmiştir¹²⁹. Ayrıca yüksek serum miR-221 seviyesine sahip hastalarda düşük ekspresyon seviyelerine göre anlamlı derecede daha düşük bir sağkalım oranına sahip olur bu da serum miR-221'in HCC tanısında potansiyel bir biomarker olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

HBV ile ilişkili HCC'de potansiyel biomarker olan miR-221 ile ilgili yapılan araştırmalardan Zhu ve ark¹⁶². Çin'de, 2018 yılında yaptığı bir çalışmada 7'si HBV ile ilişkili 18 HCC dokusu ve tümör olmayan doku örneklerinden ilk olarak mikroarray yöntemi ile 23 miRNA analizi yapmış ve bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri RT-PCR metodu ile tespit edilmiştir. Çalışmada HCC dokusunun tümör olmayan dokulara göre karşılaştırıldığında, 10 miRNA (miR-106b-5p, miR-93-5p, miR-6090, miR4485-5p, miR-3651, miR-130b-3p, miR-222-3p, miR532-3p, miR-221-3p ve miR-3188)

ekspresyon seviyeleri yüksek iken, 13 miRNA (miR-375, miR-338-3p, miR-214-3p, miR-8089, miR-199a-3p, miR-486-5p, miR7845-5p, miR-4270, miR-10a-5p, miR-125b-5p, miR195-5p, miR-424-5p ve miR-378d) ekspresyon seviyeleri düşük bulunmuştur. Sonuç olarak potansiyel olarak HCC'nin tanısal bir aracı olarak hizmet eden, karaciğer hastalığının ilerlemesinde rol alan miRNA çalışmalarının genişletilmiş yorumlarına yönelik çalışmanın sağlanmasına yardımcı olabilir.

Li ve ark¹⁶³. Çin'de, 2018 yılında yaptığı çalışmada miR-221 ekspresyonunun HCC hastalarında klinik patolojik özellikler ve prognoz ile ilişkili olup olmadığını araştırmış nanoparçacık bazlı bir miRNA dağıtım sistemi geliştirerek terapötik etkinliğini in vitro ve in vivo olarak saptamıştır. Çalışma için 45 HCC (29 HBV ile ilişkili) hastasına ve kontrol grubuna ait serum ve doku örnekleri ile karaciğer kanser hücre hattı (Bel-7402, HepG2, Huh7 ve HCCLM3) ve normal karaciğer hücre hattı (LO-2) kullanılmıştır. miR-221 düzeyleri ilk önce karaciğer kanseri hücre dizilerinde, dokularında ve serum örneklerinde RT PCR ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda miR-221 ekspresyon seviyeleri serum, doku ve karaciğer kanser hücre dizilerinde normal gruplara göre oldukça yüksek bulunmuştur. HCC'li hastaların kontrol grubuna göre serum miR-221'in ROC analizi değerlendirilmesinde AUC değeri 0.945 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular nanoparçacık bazlı bir miRNA dağıtım sisteminin potansiyel olarak güvenli ve etkili bir tedavi olarak hizmet edebileceğini ve miR-221'in de HCC tanısında potansiyel bir biomarker olabileceğini göstermektedir.

miR-223 ekspresyonu HCC hastalarının dokusunda azalma gösterirken serumunda artmıştır. miR223'ün baskısı c-myc ekspresyonunun artmasına yol açar. miR-223'ün HBV'a ve HBV'a bağlı olmayan HCC hücre hatlarında yeniden ekspresyonu hücre canlılığı üzerinde tutarlı bir inhibitör etki ortaya koymuştur. Yang ve ark. miR-223'ün aşırı ekspresyonu antikanser ilaçlara karşı HCC hücre duyarlılığını artırarak ABCB1 ekspresyonunu downregülasyonu yoluyla çoklu ilaç direncinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bu sebeple miR-223 artan ABCB1 ekspresyonunun neden olduğu çoklu ilaç direnci gösteren HCC hastaları için potansiyel bir terapötik biomarker olarak işlev görebilir¹⁶⁴.

HBV ile ilişkili HCC'de potansiyel biomarker olan miR-223'in serum ve dokuda yapılan araştırmalardan Bhattacharya ve ark¹⁶⁵. Kolombiya'da, 2016 yılında yaptığı

çalışmada 14 HCV, 14 HBV ve 11 viral ile ilişkili olmayan HCC hastaları, 17 kronik karaciğer hastalığı ve 14 sağlıklı bireylerden alınan serum örneklerinde ve HCC hastalarına ait doku örneklerinde miR-30e ve miR-223 ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile tespit etmiştir. Çalışmada miR-30e ve miR-223 sağlıklı bireylere kıyasla HCC hastalarının serumlarında anlamlı derecede düşük seviyelerde eksprese edilmiştir. Ayrıca miRNA'ların serum ekspresyonu kronik karaciğer hastaları ve HCC hastaları arasında da karşılaştırılmıştır. miR-30e ve miR-223 serum ekspresyonu HCC'li hastaların kronik karaciğer hastalarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Her iki miRNA ekspresyon seviyesi normal karaciğer dokusu ile karşılaştırıldığında HCC karaciğer biyopsi örneklerinde daha düşük görülmüştür. HCC'li hastaların kontrol grubuna göre ROC analizi değerlendirilmesinde serum miR-223'ün AUC değeri 1 iken doku miR-223'ün AUC değeri 0.997 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak serum miR-30e ve miR 223'ün etyolojiden bağımsız olarak HCC'nin faydalı biomarker olduğunu ve tanısal değerleri için daha fazla çalışmayı ihtiyaç olduğunu göstermiştir.

HBV ile ilişkili HCC'de potansiyel biomarker olan miR-21, miR-122, miR-182, miR-221 ve miR-223'ün serum veya dokuda yapılan çalışmalardan Lv ve ark¹⁶⁶. Çin'de, 2017 yılında yapılan bir çalışmada 75 HCC (72 HBV ile ilişkili) hastasına ve 80 kontrol gruba ait serum ve doku örneklerinden miR-21, miR-122, miR-214, miR-15b ve let-7f qRT-PCR yöntemi ile ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. miR-21 HCC doku örneklerinde kontrol gruba kıyasla anlamlı şekilde aşırı eksprese edilmiştir. miR-15b HCC dokularında upregüle görülürken miR-122 downregüle olarak tespit edilmiştir. Ayrıca miR-214 ve let-7f ekspresyonu HCC ve kontrol grubuna ait dokular arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. HCC hastalarında ve sağlıklı kontrollerde serum miRNA profili (miR-15b, miR-21, miR-122, miR-214) tespit edilmiştir. miR-21 ve miR-15b HCC serum örneklerinde kontrol grubuna göre anlamlı şekilde upregüle düzenlenirken miR-214 HCC'de önemli ölçüde downregüle olarak görülmüştür. Ancak miR-122 ekspresyonu HCC ve kontrol grubuna ait serum örnekleri arasında belirgin bir değişiklik göstermemiştir. ROC analizi ile tanısal değerlendirilmesinde HCC'li hastaların kontrol grubuna göre serum miR-21'in AUC değeri 0.771, miR-214'ün AUC değeri 0.733 ve miR-15b'nin AUC değeri 0.809 iken doku miR-21'in AUC değeri 0.738, miR-122'nin AUC değeri 0.648 ve miR-15b'nin AUC değeri 0.683 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak bu serum miRNA'larının HCC hastalarını sağlıklı

kontrollere ayırt etmek için yararlı biomarker olabileceğini göstermektedir. Dolaşımdaki miR-21, miR-122, miR-214 ve miR-15b'nin kombine belirlenmesi erken HCC ön taraması için doğru ve noninvaziv biomarker olarak hizmet etme potansiyeline sahiptir.

Nayak ve ark¹⁶⁷. Hindistan'da, 2017 yılında yaptığı bir çalışmada KHB, siroz ve HCC hastaları ile birlikte sağlıklı bireylerde serumda diferansiyel olarak eksprese edilen 84 miRNA'nın dolaşımdaki miRNA profilini belirlemek için miRNA PCR Array kullanılarak gerçekleştirmiştir. Çalışmada sağlıklı, KHB, siroz ve HCC hastasının serumunda eksojen miR-39 ve endojen SNORD95 ile normalizasyondan sonra 84 miRNA'nın diferansiyel ekspresyon profili, 2 (1.4-6.46 kat), 5 (1.40-74.54) ve 9 (1.02-14.28 kat) miRNA için belirgin bir upregüle göstermiştir. HCC'de upregüle edilen miRNA'lar (miR-16, -21 ve -221), başlangıçta lokal bölge tedavisi sırasında ve tedaviden bir ay sonra ekspresyondaki değişiklikler için ayrıca değerlendirilmiştir. Sonuç olarak bu miRNA'lar lokal bölge tedavisi alan HCC hastalarında prognostik ve terapötik biomarker olarak işlev görebilir.

Trung ve ark¹⁶⁸. Vietnam'da, 2016 yılında AFP seviyelerinin değerlendirilmesi ile birlikte bir miRNA paneli oluşturmak ve HCC tanısındaki performansını değerlendirmek için yaptıkları çalışmada 118 HBV ile ilişkili HCC, 69 KS, 100 KHB ve 119 sağlıklı kontrol grubunda miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, hsa-miR-26a-5p, miR-27a-3p, miR-18b-5p, miR-29a, miR-29c, miR-133a, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-145, hsa-miR-505-5p ekspresyon seviyeleri RT-PCR metodu ile tespit edilmiştir. İlk olarak miR-21, miR-29a, miR-29c, miR-122, miR-133a, miR-143-3p, miR-192 ve miR-223 ekspresyon seviyeleri 8 HCC hastalarında KHB hastalara kıyasla en az iki kat daha yüksek bulunmuştur. Sonraki çalışmada <35 Ct değerine sahip miRNA'lar analizlere dahil edilmiştir. Bunun sonucunda ise miR-21, miR-122 ve miR-192 HCC hastalarının serumlarında KHB hastalarına kıyasla anlamlı şekilde aşırı ekspresyonu görülmüştür. Doğrulama fazında ise miR-21, miR-122 ve miR-192 ekspresyon seviyeleri HBV ile ilişkili HCC hastalarında en yüksek, ardından sırası ile HBV ile ilişkili karaciğer sirozu ve KHB gruplarını takip etmiş en düşük seviye ise sağlıklı bireylerde tespit edilmiştir. Çalışmada miR-21, miR-122 ve miR-192 AFP seviyeleri ile pozitif korelasyon göstermiştir. ROC analizi ile tanısal değerlendirilmesinde HCC'li hastaların kontrol

grubuna göre serum miR-21'in AUC değeri 0.698 ve miR-122'nin AUC değeri 0.775 iken HCC'li hastalarının KHB'li hastalara göre miR-21'in AUC değeri 0.775 ve miR-122'nin AUC değeri 0.922 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak AFP ile birlikte miR-21, miR-122 ve miR-192, HBV hastalarında HCC hastalarında özellikle normal AFP seviyeli HBV ile ilişkili karaciğer sirozu hastalarında veya küçük tümör boyutlarına sahip HCC hastalarında tanıyı geliştirmek için uygulanabilecek biomarkerdir.

Shen ve ark¹⁶⁹. Amerika'da, 2015 yılında yaptığı bir çalışmada 302 HCC dokusu ve 48 tümör olmayan dokuda 33 miRNA analizi yapmıştır. Çalışmada 5 miRNA (miR-10b, miR-182, miR-183, miR-21 ve miR-452) HCC tümör dokusunda kat değişiklikleriyle önemli ölçüde upregüle edilirken, 28 miRNA tümör dokusunda downregüle göstermiştir. miR-21 ve miR-182 HBV ile ilişkili HCC dokularında tümör olmayan dokulara göre 2 katdan fazla ekspresyon seviyesi görülmüştür. Sonuç olarak bu bulgular tümör oluşumun altında yatan mekanizmaları daha iyi anlamak ve tümöre özgü miRNA'ları hedef alarak spesifik kanserleri önleme ve tedaviyi geliştirmek için umut verici uygulamalara sahiptir.

Thurnherr ve ark¹⁷⁰. Singapur'da 2013 yılında yaptığı bir çalışmada 100 HCC (58 HBV ile ilişkili)'ye ait tümör olan ve tümör olmayan karaciğer dokularındaki miRNA ve mRNA ekspresyon profillerini birleştirerek miRNA'ların rollerini ve bunların HCC'deki hedeflerini belirlemiştir. Analiz sonucunda 829 olgun miRNA'nın 32 tanesi önemli derecede ekprese edildiği tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz bu miRNA'ların 6'sı kendi silico ile öngörülen hedef mRNA'ların önemli bir kısmını düzenlediğini göstermiştir. Bu miRNA'lardan 3'ü (miR-26a, miR-122 ve miR-130a) HCC'de downregüle edilmiştir Diğer 3 miRNA (miR-21, miR-93 ve miR-221) HCC'de upregüle düzenlenmiştir ve downregüle gen hedefleri temel olarak metabolizma ve bağışıklık sisteminde yer almaktadır. Sonuç olarak bu çalışmadaki analiz HCC'nin prognozu için potansiyel biomarker olarak kullanılacağını göstermiştir.

Hung ve ark¹⁷¹. Tayvan'da, 2013 yılında yaptığı çalışmada 15 KHB, 30 KHB ile ilişkili displastik nodül ve 120 HBV ile ilişkili HCC hastalarında 10 kanser ile ilişkisi olan miRNA ekspresyon seviyelerini qRT-PCR ile tespit etmiştir. Çalışmada kontrol grubunda miR-16, miR-122, miR-221, miR-199, miR-21, let-7b ve miR-15b serum düzeyleri HCC'li hastalara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Diplastik nodül

hastalarında kontrol grubuna göre serum miR-122 düzeyi daha yüksek görülmüştür. Serum miR-16, miR-122, miR-221, let-7b ve miR-15b düzeyleri ise diplastik nodüllü hastalarda HCC grubuna göre anlamlı derecede düşük tespit edilmiştir. Ayrıca diplastik nodül olan hastalar HCC'ye ilerlerken serum let-7b, miR-15b ve miR-122 seviyeleri önemli ölçüde artmıştır. Biomarker olan AFP ve miR-122'nin yanı sıra let-7b HCC'yi diplastik nodül'den ayırt etmek için benzer bir performans göstermiştir. ROC analizi ile tanısal değerlendirilmesinde HCC'li hastaların kontrol grubuna göre serum miR-122'nin AUC değeri 0.648 ve let 7b'nin AUC değeri 0.633 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak HBV ile ilişkili HCC hastalarının serumunda upregüle olan miR-122 ve let-7b HCC'yi diplastik nodül'den ayırt etmek için yararlı biomarker olabileceği belirtilmiştir.

Xu ve ark¹⁷². Çin'de, 2010 yılında yaptığı bir çalışmada 101 HCC (76 HBV ile ilişkili) hastası, 48 KHB ve 89 sağlıklı kontrol grubuna ait serum örneklerinden miR21, miR-122 ve miR-223 ekspresyon seviyeleri qRT-PCR metodu ile tespit edilmiştir. miR-21, miR-122 ve miR-223 ekspresyon düzeyleri HCC'li hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek görülmüştür. Bununla birlikte bu yüksek serum miRNA'ları KHB'li hastalarda da tespit edilmiştir. Ayrıca KHB'li hastalarda serum miR-21 ve miR-122 seviyeleri HCC'li hastalardan daha yüksek görülürken miR-223 için önemli bir fark bulunamamıştır. ROC analizi ile tanısal değerlendirilmesinde HCC'li hastaların kontrol grubuna göre serum miR-21'in AUC değeri 0.870, miR-122'nin AUC değeri 0.790 ve miR-223'ün AUC değeri 0.860 olarak görülmüştür. KHB'li hastaların kontrol grubuna göre değerlendirmesinde miR-21'in AUC değeri 0.910, miR-122'nin AUC değeri 0.930 ve miR-223'ün AUC değeri 0.880 olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan ROC eğri analizi bu serum miRNA'larının HCC veya KHB'li hastaları sağlıklı kontrollerden ayırt etmek için yararlı biomarker olabileceğini ancak bu durum KHB'li hastalardan HCC'li hastaları ayırmada kullanılmayacağını göstermiştir. Sonuç olarak HCC veya KHB'li hastaların serum miR-21, miR-122 ve miR-223'ün arttığını göstermektedir ve bu miRNA'lar karaciğer hasarı için yeni biomarker olarak hizmet etme potansiyeline sahiptir.

Karakatsanis ve ark¹⁶¹. Almanya'da, 2011 yılında yaptığı bir çalışmada HCC ve intrahepatik kolanjiokarsinom (ICC) olan hastalarda bazı miRNA'ların (miR-21, -31, -

122, -145, -146a, -200c, -221, -222 ve -223) ekspresyon seviyelerinin yanı sıra prognostik önemlerini de değerlendirmiştir. 60 HCC (26 HBV ile ilişkili) hastası ve 98 sağlıklı bireylerden alınan doku örneklerinden miRNA ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile tespit edilmiştir. miR-21, miR-31, miR-122, miR-221 ve miR-222 HCC dokularında normal karaciğer dokulara göre belirgin şekilde daha yüksek seviyelerde eksprese edilirken miR-145, miR-146a, miR-200c ve miR-223 downregüle edildiği görülmüştür. Sonuç olarak HCC dokularında miR-21, miR-31, miR-122 ve miR-221 ekspresyonunun siroz ile korele olduğunu, miR-21 ve miR-221 de tümör evresi ve HCC hastalarının kötü prognozu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarından Küçükkara ve ark¹⁷³. Sakarya’da, 2018 yılında yaptığı çalışmada 60 hasta (HBV ile ilişkili HCC (18), HCV ile ilişkili HCC (8), HBV ile ilişkili karaciğer sirozu (15) ve HCV ile ilişkili karaciğer sirozu (19) ve 26 sağlıklı gönüllü dahil edilmiş olup hastalardan alınan serum örneklerinden qRT-PCR yöntemi ile hsa-miR-21-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-122-3p ve hsa-miRNA-192-5p’nin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Çalışmada HBV ile ilişkili HCC hastalarında kontrol grubuna göre hsa-miR-21-3p ve hsa-miR-122-3p upregüle olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak HBV ile ilişkili HCC hastaların tanısında hsa-miR-21-3p ve hsa-miR-122-3p’nin noninvaziv biomarker olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Girar ve ark¹⁷⁴. Mersin’de, 2014 yılında yaptığı bir çalışmada HBV ile ilişkili HCC’nin erken teşhisinde noninvaziv biomarker olarak bazı serum/plazma miRNA’larının potansiyelini araştırmıştır. Çalışmaya 24 KHB, 22 HBV pozitif siroz, 20 HBV ile ilişkili HCC ve 28 kontrol grubunda 24 miRNA (let-7c, miR-92a-3p, 423-5p, 150-5p, 223-3p, 125b-5p, 342-3p, miR-206, 122-5p, 375, 223-5p, 10a-5p, 23b-5p, 99a-5p, 23a-5p, 10a-3p, 122-3p, 125b-1-3p, 23b-3p, 125b-2-3p, 23a-3p, 92a-1-5p, 92a-2-5p, 99a-3p) ekspresyon düzeylerini qRT-PCR kullanarak tespit etmiştir. Çalışma sonucunda HBV grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında miR-125b-5p ve miR-223-3p’nin ekspresyon seviyeleri HBV pozitif siroz grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında miR-223-3p, miR-122-5p ve miR-125b-5p’nin ekspresyon seviyeleri ve HBV ile ilişkili HCC grubunda kontrol grubuna kıyasla miR-223-3p, miR-92a-3p, miR-122-5p ve miR-125b-5p’nin ekspresyon seviyeleri upregüle olarak bulunmuştur. Sonuç olarak miR-125b-5p ve miR223-3p’nin karaciğer hastalığının KHB evresinde

HBV pozitif HCC'nin çok erken zamanlarında noninvazif biomarker olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Demirgan ve ark.¹⁷⁵. İstanbul'da, 2019 yılında yaptığı çalışmada HBV ilişkili 20 HCC hastası, 20 HBV pozitif hastası ve 20 sağlıklı bireylerden alınan serum ve doku örneklerinden miR-16, miR-28, miR-122, miR-221, miR-224 ve miR-501 ekspresyon seviyelerini RT-PCR ile tespit etmiştir. Çalışma sonucunda HCC ile HBV ve kontrol grubu karşılaştırıldığında miR-16, miR-221, miR-224 ve miR-501'nin serum ve doku ekspresyon seviyesinde artış, miR-28 ve miR-122 serum ve doku ekspresyonunda azalma görülmüştür. ROC analizi değerlendirilmesinde miR-16'nın AUC değeri 0.591, miR-28'in AUC değeri 0.798, miR-122'nin AUC değeri 0.795, miR-221'in AUC değeri 0.679, miR-224'ün AUC değeri 0.943 ve miR-501'in AUC değeri 0.918 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak miR-18'in serum ekspresyon seviyesi HCC'nin erken tanısı için biomarker olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda HBV ile ilişkili HCC hastaların tanısında potansiyel biomarker olarak kullanılabilecek olan miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-182-5p, miR-221-5p ve miR-223-5p'nin serum ve dokuda araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda 35 KHB hastası, 35 HBV ile ilişkili HCC hastası ve 30 sağlıklı bireylerden alınan serum ve doku örneklerinden miRNA ekspresyon düzeyleri qRT-PCR metodu ile araştırılmıştır.

Serum miRNA'ların ekspresyon seviyeleri tek tek bakıldığında, serum miR-21-5p ekspresyon seviyeleri HCC hastaları ile KHB hastalarının kıyaslanması sonucunda HCC'li hasta serumundaki ekspresyon seviyesinin KHB hastalarına göre 6.2 kat arttığı, HCC hastalarının kontrol grubuna göre serum ekspresyon seviyesi 10.7 kat arttığı saptanmıştır. Serumdaki bu artış seviyeleri istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.0461$, $p<0.0402$). miR-21-5p ekspresyon seviyesi serumda yapılan çalışmalardan Zhang ve ark.'nın ve Guo ve ark.'nın, Lv ve ark.'nın, Nayak ve ark.'nın, Trung ve ark.'nın, Hung ve ark.'nın ve Xu ve ark.'nın yaptıkları sonuçlarda benzerlik görülmüştür. Ülkemizde yapılan çalışmadan Küçükkara ve ark.'nın yaptığı bulgulara benzer sonuçlar elde edilmiştir^{150,152,166-168,171,172}.

Serum miR-122a-5p ekspresyon seviyesi çalışmamızda HCC hastalarının KHB hastalarına göre 2.1 kat arttığı ve kontrol grubuna göre 7.7 kat arttığı görülmüştür. miR-

122a-5p'nin serum ekspresyon seviyesindeki bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.0480$ ve $p<0.0497$). miR-122a-5p serum ekspresyon seviyesi ile ilgili yapılan çalışmalardan Tan ve ark.'nın, Dai ve ark.'nın, Trung ve ark.'nın, Hung ve ark.'nın ve ülkemizden Girar ve ark.'nın yaptığı çalışmalar benzerlik göstermiştir^{155-154,155,168,171,174}. Xu ve ark.'nın serumda yaptığı çalışmada miR-122 seviyesi HCC hastalarında kontrol grubuna göre upregüle bulunurken KHB'li hastalara göre downregüle olarak tespit edilmiştir¹⁷². Lv ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise serumda anlamlı bir fark görülmemiştir¹⁶⁶. Ülkemizde Balkan ve ark.'nın yaptığı çalışmada miR-122'in ekspresyon seviyesi HCC ve kontrol grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır¹⁵⁷. Bunun sebebi alkolden bağımsız karaciğer yağlanması olan hastaların kontrol grubu olarak dahil edilmesi ve sağlıklı gönüllülerin olmaması olabilir. Diğer bir sebebi ise hem hasta hem de kontrol grubunda vaka sayısının az olmasıdır.

Serum miR-182-5p ekspresyon seviyesi HCC hastalarının KHB hastalarına göre 1,6 kat ve kontrol grubuna göre 2.2 kat artması istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p<0.1521$ ve $p<0.2602$). Bu sonucumuz serumda Zhang ve ark.'nın yaptığı çalışmaya benzerlik görülmüştür. Riazalhosseini ve ark.'nın yaptığı çalışmada miR-182 serum ekspresyon seviyesi downregüle olarak tespit edilmiştir^{159,160}. Bunun sebebi çalışma grubumuzda örnek sayısının az olmasından kaynaklanıyor olabilir. miR-182-5p'nin daha fazla çalışmalarda yer alması tavsiye edilir.

Serum miR-221-5p ekspresyon seviyesi HCC hastaların KHB'li hastalara göre 4.3 kat arttığı ve HCC'li hastalarının kontrol grubuna göre 8.1 kat arttığı saptanmıştır. Serumdaki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.0211$ ve $p<0.0494$). Bu bulgumuz serumda, Li ve ark.'nın, Nayak ve ark.'nın, Hung ve ark.'nın ve ülkemizden Demirgan ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda benzerlik görülmüştür^{163,167,171,175}.

Serum miR-223-5p ekspresyon seviyesi HCC hastaların KHB'li hastalara göre 2.2 kat azaldığı ve HCC'li hastalarının kontrol grubuna göre 5.8 kat azaldığı saptanmıştır. Serumdaki bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.0126$ ve $p<0.0274$). Bu sonucumuz serumda Bhattacharya ve ark.'nın yaptığı çalışmaya benzerlik gösterirken Trung ve ark.'nın ve ülkemizden Girar ve ark.'nın yaptığı bulgulara benzerlik göstermemiştir^{165,168,174}. Xu ve ark.'nın yaptığı çalışmada serum

miR-223 ekspresyon seviyesi HCC hastalarında kontrol grubuna göre yüksek iken KHB'li hastalara göre belirgin bir fark görülmemiştir¹⁷².

Doku miRNA'ların ekspresyon seviyeleri tek tek bakıldığında, doku miR-21-5p ekspresyon seviyeleri HCC hastaları ile KHB hastalarının kıyaslanması sonucunda HCC'li hasta serumundaki ekspresyon seviyesinin KHB hastalarına göre 6 kat arttığı, HCC hastalarının kontrol grubuna göre doku ekspresyon seviyesi 14.3 kat arttığı saptanmıştır. Serumdaki bu artış seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.0136$ ve $p<0.0467$). miR-21-5p ekspresyon seviyesi dokuda yapılan çalışmalardan Yoon ve ark.'nın, Guo ve ark.'nın, Lv ve ark.'nın, Shen ve ark.'nın, Thurnherr ve ark.'nın ve Karakatsanis ve ark.'nın, yaptıkları sonuçlara benzerlik görülmüştür^{151,152,161,166,169,170}.

Doku miR-122a-5p ekspresyon seviyesi çalışmamızda HCC hastalarının KHB hastalarına göre 2 kat azaldığı, kontrol grubuna göre 2.9 kat azaldığı saptanmıştır. Doku daki bu azalış istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.0320$ ve $p<0.0086$). miR-122a-5p doku ekspresyon seviyesi ile ilgili yapılan çalışmalardan Qiao ve ark.'nın, Lv ve ark.'nın, Thurnherr ve ark.'nın ve ülkemizden Demirgan ve ark.'nın yaptıkları sonuçlarda benzerlik görülmüştür^{156,166,170,175}. Fakat Karakatsanis ve ark.'nın HCC'li hastaları ve kontrol grubunu karşılaştırdığı çalışmada miR-122-5p doku ekspresyon seviyesini HCC'li hastalarında kontrol grubuna göre upregüle olduğunu belirtmiştir¹⁶¹. Bu farklılığın sebebi HCC hastaların çok az bir kısmı HBV ile ilişkili olmasından kaynaklanabilir.

Doku miR-182-5p ekspresyon seviyesi HCC hastalarının KHB hastalarına göre 4.6 kat artması istatistiksel olarak anlamlı bulunurken kontrol grubuna göre 3 kat artması istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p<0.0468$ ve $p<0.3011$). Bu sonucumuz Shen ve ark.'nın. doku miR-182-5p'nin ekspresyon seviyesi ile ilgili yapılan çalışmaları bizim bulgumuz ile aynı sonuçlar elde edilmiştir¹⁶⁹.

Doku miR-221-5p ekspresyon seviyesi HCC hastaların KHB'li hastalara göre 5.4 kat artması ve kontrol grubuna göre de 8.6 kat artması istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür ($p<0.0126$ ve $p<0.0460$). Bu sonucumuz dokuda Karakatsanis ve ark.'nın, Li ve ark.'nın, Thurnherr ve ark.'nın ve ülkemizden Demirgan ve ark.'nın miR-221-5p

ile ilgili yapılan ekspresyon kat değişimleri bizim bulgumuz ile benzerlik gösterirken Zhu ve ark.'nın yaptığı çalışmada farklılık göstermiştir^{161-163,170,175}.

Doku miR-223-5p ekspresyon seviyesi HCC hastaların KHB'li hastalara göre 2.8 kat azalması ve kontrol grubuna göre de 3.7 kat azalması istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür ($p<0.0499$ ve $p<0.0354$). Doku miR-223-5p ile yapılan çalışmalardan Bhattacharya ve ark.'nın ve Karakatsanis ve ark.'nın bulguları bizim çalışmamızda benzerlik göstermiştir^{161,165}. miR-223-5p doku ekspresyon çalışmaları daha fazla yer alması tavsiye edilir.

Çalışmamızda ROC analiz ile miRNA'ların tanısal değerlendirilmesi sonucu HCC'li hastalarının kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında serum miR-21-5p'nin AUC değeri 0.763, miR-122a-5p'nin AUC değeri 0.819, miR-182-5p'nin AUC değeri 0.589, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.721 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.801 olarak tespit edilirken doku miR-21-5p'nin AUC değeri 0.801, miR-122a-5p AUC değeri 0.629, miR-182-5p AUC değeri 0.650, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.706 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.560 olarak görülmüştür. Bu bulgumuz Zhang ve ark.'nın, Guo ve ark.'nın, Dai ve ark.'nın, Zhang ve ark.'nın, Li ve ark.'nın, Bhattacharya ve ark.'nın, Lv ve ark.'nın, Trung ve ark.'nın, Hung ve ark.'nın, Xu ve ark.'nin ve ülkemizden Demirgan ve ark.'nın yaptığı çalışmaya benzerlik göstermiştir^{150,152,155,160,163,165,166,168,171,172,175}.

HCC'li hastalarının KHB'li hastalara göre serum ekspresyon seviyelerinin ROC analizi ile tanısal değerlendirilmesinde serum miR-21-5p'nin AUC değeri 0.650, miR-122a-5p'nin AUC değeri 0.570, miR-182-5p'nin AUC değeri 0.5, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.638 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.613 olarak görülürken doku miR-21-5p'nin AUC değeri 0.709, miR-122a-5p AUC değeri 0.678, miR-182-5p AUC değeri 0.765, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.706 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.635 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgumuz Guo ve ark.'nın, Tan ve ark.'nın, Dai ve ark.'nın, Trung ve ark.'nın, ve Xu ve ark.'nın yaptığı çalışmalara benzerlik göstermiştir^{152,154,155,168,172}.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

HBV ile ilişkili HCC hastaların tanısında potansiyel biomarker olarak kullanılabilecek olan miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-182-5p, miR-221-5p ve miR-223-5p'nin kontrol grubu ile KHB ve HCC hastalarını ikili gruplar halinde planlayarak serum ve doku ekspresyon seviyelerini karşılaştırdığımız çalışmanın sonucunda;

1. HCC hastalarında KHB'li hastalarına ve kontrol grubuna göre miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-182-5p ve miR-221-5p serum ekspresyon seviyesi upregüle iken miR-223-5p serum ekspresyon seviyesi downregüle görülmüştür.
2. HCC hastalarında KHB'li hastalarına ve kontrol grubuna göre miR-21-5p, miR-182-5p ve miR-221-5p doku ekspresyon seviyesi upregüle iken miR-122a-5p ve miR-223-5p doku ekspresyon seviyeleri downregüle görülmüştür.
3. ROC analiz ile miRNA'ların tanısal değerlendirilmesi sonucu HCC'li hastalarının kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında serum miR-21-5p'nin AUC değeri 0.763, miR-122a-5p'nin AUC değeri 0.819, miR-182-5p'nin AUC değeri 0.589, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.721 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.801 olarak tespit edilirken doku miR-21-5p'nin AUC değeri 0.801, miR-122a-5p AUC değeri 0.629, miR-182-5p AUC değeri 0.650, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.706 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.560 olarak görülmüştür.
4. HCC'li hastalarının KHB'li hastalara göre serum ekspresyon seviyelerinin ROC analizi ile tanısal değerlendirilmesinde miR-21-5p'nin AUC değeri 0.650, miR-122a-5p'nin AUC değeri 0.570, miR-182-5p'nin AUC değeri 0.5, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.638 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.613 olarak görülürken doku miR-21-5p'nin AUC değeri 0.709, miR-122a-5p AUC değeri 0.678, miR-182-5p AUC değeri 0.765, miR-221-5p'nin AUC değeri 0.706 ve miR-223-5p'nin AUC değeri 0.635 olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, HBV ile ilişkili HCC'de potansiyel biomarker olan miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-182-5p, miR-221-5p ve miR-223-5p serum ve doku ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması ve ROC analizi ile tanısal etkinliğini değerlendirilmesinde

miR-21-5p, miR-122a-5p, miR-221-5p ve miR-223-5p HCC'yi KHB ve sağlıklı bireylerden erken tanıda ayırt etmede biomarker olarak kullanabileceğini göstermiştir. Çalışmamız ile elde ettiğimiz bulgular aynı hastadan alınan serum ve doku örneklerinden yapılan az sayıdaki çalışmaya önemli katkılar sağlar nitelikte olup bildiğimiz kadarıyla bölgemizde bu konuda yapılan ilk çalışmadır. Çalışmamızın hızlı tanıya ek olarak bu miRNA'lar ile birlikte tümör lezyon çapının ve AFP seviyeleri ile birlikte değerlendirilmesi veya tek miRNA yerine panel miRNA'ların belirlenmesi HCC için yüksek doğru tanı ve prognostik modeller oluşturmamıza büyük fayda sağlayacak ve risk faktörleri olan kişiler için erken tanı, tümör izleme ve prognoz öngörüsüne önemli ışık tutacaktır. Serum miRNA'ların noninvaziv bir şekilde elde edilebilir olması, düşük pH, RNAaz'a dirençli olması ve tekrarlanabilir olması sebebiyle biomarker olması ön plana çıkmaktadır. miRNA'ların stabilitesi, yüksek duyarlığı ve kanda tespit edilmesi ile ulaşılabilirliğinin kolay olması kanda dolaşan miRNA'ların kanser tedavisinde kullanılmasına olanak sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **McMahon BJ.** The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, **2009**; 49(5):45-55.
2. **World Health Organization.** Global Hepatitis Report, **2017**.
3. **GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators.** Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, **2015**; 385:117-171.
4. **Rehermann, B, Nascimbeni, M.** Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**; 5:215-229.
5. **El-Serag HB.** Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, **2012**; 142: 1264-1273.
6. **Clinkenbeard EL, Butler JE, Spear BT.** Pericentral activity of AFP enhancer E3 and glutamine synthetase upstream enhancer in the adult liver are regulated by beta-catenin. *Hepatology*, **2012**; 56(5):1892-901
7. **Yang C, Wei W.** The miRNA expression profile of the uveal melanoma. *Sci China Life Sci*, **2011**; 54: 351-358.
8. **Wang G, Dong F, Xu Z, Sharma S, Hu X, Chen D, Zhang L, Zhang J, Dong Q.** MicroRNA profile in HBV-induced infection and hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, **2017**;17(1):805.
9. **Borel F, Konstantinova P Jansen PL.** Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, **2012**; 56(6):1371-83.
10. **Trepo C.** A brief history of hepatitis milestones. *Liver Int*, **2014**; 34:1. 29-37.
11. **Oon GCJ.** Viral hepatitis - The silent killer. *Annals Academy of Medicine*, **2012**; 41: 279-80.
12. **Gerlich WH.** Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology Journal*, **2013**; 10:239-245.
13. **Schaefer S.** Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*, **2007**; 13(1): 14-21.
14. **Seeger C, Mason WS.** Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*, **2015**; 672-86.
15. **Venkatakrishnan B, Zlotnick A.** The Structural Biology of Hepatitis B Virus: Form and Function. *Annu Rev Virol*, **2016**; 29;3(1):429-451.
16. **Baumert TF, Meredith L, Ni Y, Felmlee DJ, McKeating JA, Urban S.** Entry of hepatitis B and C viruses-recent progress and future impact. *Curr Opin Virol*, **2014**; 4:58-65.
17. **Hu J.** Hepatitis B Virus Virology and Replication. Chapter from book Hepatitis B Virus in Human Diseases. **2016**; 1-34.
18. **Block TM, Guo H, Guo JT.** Molecular virology hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis*, **2007**; 11:685-706.

19. **Kann M.** Structural and Molecular Virology. In: Lai CL, Locarnini S(eds), Hepatitis B Virus. 2nd ed. London: *International Medical Press*, 2008; 2-2.
20. **Ezzikouri S, Ozawa M, Kohara M, Elmdaghri N, Benjelloun S, Tsukiyama-Kohara K.** Recent insights into hepatitis B virus-host interactions. *J Med Virol*, **2014**; 86:925-932.
21. **İnan N, Tabak F.** Hepatitis B Virus: Biology and Life Cycle. *Viral Hepatitis Journal*, 2015; 21(1):1-7.
22. **Doo EC, Ghany MG.** Hepatitis B virology for clinicians. *Clin Liver Dis*, **2010**; 14:97-408.
23. **Tseng TC, Kao JH.** Clinical utility of quantitative HBsAg in natural history and nucleos(t)ide analogue treatment of chronic hepatitis B: new trick of old dog. *J Gastroenterol*, **2013**; 48:13-21.
24. **Jung J, Hwang SG, Chwae YJ, Park S, Shin HJ, Kim K.** Phosphoacceptors threonine 162 and serines 170 and 178 within the carboxyl-terminal RRRS/T motif of the hepatitis B virus core protein make multiple contributions to hepatitis B virus replication. *J Virol*, **2014**; 88(16):8754–67.
25. **Ludgate L, Ning X, Nguyen DH, Adams C, Mentzer L, Hu J.** Cyclin-dependent kinase 2 phosphorylates S/T-P sites in the hepadnavirus core protein C-terminal domain and is incorporated into viral capsids. *J Virol*, **2012**; 86(22):12237–50.
26. **Slagle BL, Andrisani OM, Bouchard MJ, Lee CG, Ou JH, Siddiqui A.** Technical standards for hepatitis B virus X protein (HBx) research. *Hepatology*, **2015**; 61(4):1416–24.
27. **Watashi K, Urban S, Li W, Wakita T.** NTCP and beyond: opening the door to unveil hepatitis B virus entry. *Int J Mol Sci*, **2014**; 15:2892-2905.
28. **Urban S, Schulze A, Dandri M, Peterson J.** The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol*, **2010**; 52:282-284.
29. **Schmitz A, Schwarz A, Foss M, Zhou L, Rabe B, Hoellenriegel J et al.** Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog.* **2010**.
29. **Karayiannis P.** Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatol Int*, **2017**; 11:500–508.
30. **Zhang X, Hou J, Lu M.** Regulation of hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs. *Front Genet*, **2013**; 14:202.
31. **Beck J, Nassal M.** Hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, **2007**; 13:48-64.
32. **Grimm D, Thimme R, Blum HE.** HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol Int*, **2011**; 5:644 653.
33. **Prange R.** Host factors involved in hepatitis virus maturation, assembly, and egress. *Med Microbiol Immunol*, **2012**; 201:449-461.
34. **Yuen MF, Chen DS, Dusheiko GM, Janssen HLA, Lau DTY, Locarnini SA, Peters MG, Lai CL.** Hepatitis B virus infection. Nature Reviews. *Disease Primers*, **2018**; 4:18035.
35. **Revill P, Yuan Z.** New insights into how HBV manipulates the innate immune response to establish acute and persistent infection. *Antivir. Ther*, **2013**; 18:1–15.
36. **Lebossé F, Testoni B, Fresquet J, Facchetti F, Galmozzi E, Fournier M, Hervieu V, Berthillon P, Berby F, Bordes I, Durantel D, Levrero M, Lampertico P, Zoulim F.**

Intrahepatic innate immune response pathways are downregulated in untreated chronic hepatitis B. *J. Hepatol*, **2017**; 66:897–909.

37. **Xia Y, Stadler D, Lucifora J, Reisinger F, Webb D, Hösel M, Michler T, Wisskirchen K, Cheng X, Zhang K, Chou WM, Wettengel JM, Malo A, Bohne F, Hoffmann D, Eyer F, Thimme R, Falk CS, Thasler WE, Heikenwalder M, Protzer U.** Interferon- γ and tumor necrosis factor- α produced by T cells reduce the HBV persistence form, cccDNA, without cytolysis. *Gastroenterology*, **2016**; 150: 194–205.
38. **Xia, Y, Protzer U,** Control of hepatitis B virus by cytokines. *Viruses*, **2017**; 9:18
39. **Jiang M, Broering R, Trippler M, Poggenpohl L, Fiedler M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF.** Toll-like receptor-mediated immune responses are attenuated in the presence of high levels of hepatitis B virus surface antigen. *J. Viral Hepat*, **2014**; 21:860–872.
40. **Dai K, Huang L, Sun X, Yang, L. Gong Z.** Hepatic CD206-positive macrophages express amphiregulin to promote the immunosuppressive activity of regulatory T cells in HBV infection. *J. Leukoc. Biol*, **2015**; 98:1071–1080.
41. **Zhang YY.** New Strategy Treating Hepatitis B Virus (HBV) Infection: A Review of HBV Infection Biology. Chapter 17. **2016**; 374-394.
42. **Dhiman RK.** National Guidelines for Diagnosis & Management of Viral Hepatitis **2018**.
43. **Lamontagne RJ, Bagga S, Bouchard MJ.** Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Res*, **2016**; 2:163-186.
44. **Keng VW, Tschida BR, Bell JB, Largaespada DA.** Modeling hepatitis B virus X-induced hepatocellular carcinoma in mice with the Sleeping Beauty transposon system. *Hepatology*, **2011**; 53(3):781–790.
45. **Chen CJ, Yang HI.** Natural history of chronic hepatitis B REVEALed. *Journal of gastroenterology and hepatology*, **2011**; 26(4):628–638.
46. **Wang Z, Jin W, Jin H, Wang X.** mTOR in viral hepatitis and hepatocellular carcinoma: function and treatment. *BioMed research international*, **2014**; 2014:735672.
47. **Rawat S, Clippinger AJ, Bouchard MJ.** Modulation of apoptotic signaling by the hepatitis B virus X protein. *Viruses*. **2012**; 4(11):2945–2972.
48. **An P, Xu J, Yu Y, Winkler CA.** Host and Viral Genetic Variation in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Front Genet*, **2018**; 19:9:261.
49. **Jiang D, KSun J, Cao G, Liu Y, Lin D, Gao YZ.** Genetic variants in STAT4 and HLA-DQ genes confer risk of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet*, **2013**; 45:72–75.
50. **Sopipong W, Tangkijvanich P, Payungporn S, Posuwan N, Poovorawan Y.** The KIF1B (rs17401966) Single Nucleotide Polymorphism is not Associated with the Development of HBV-related Hepatocellular Carcinoma in Thai Patients. *Asian Pacific J. Cancer Prevent*, **2013**; 14:2865–2869.
51. **Yang X, Yu D, Ren Y, Wei J, Pan W, Zhou C.** Integrative Functional Genomics Implicates EPB41 Dysregulation in Hepatocellular Carcinoma Risk. *Am. J. Hum. Genet*, **2016**; 99: 275–286.

52. **Franceschini N, van Rooij FJ, Prins BP, Feitosa MF, Karakas M, Eckfeldt JH.** Discovery and fine mapping of serum protein loci through transethnic meta-analysis. *Am. J. Hum. Genet*, **2012**; 91, 744–753.
53. **Swanton C, Soria JC, Bardelli A, Biankin A, Caldas ., Chandarlapaty, S.** Consensus on precision medicine for metastatic cancers: a report from the MAP conference. *Ann. Oncol*, **2016**; 27:1443–1448.
54. **Borah S, Xi L, Zaug AJ, Powell NM, Dancik GM, Cohen SB, Costello JC, Theodorescu D, Cech TR.** Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science*, **2015**; 347:1006–1010.
55. **Yang X, Guo X, Chen Y, Chen G, Ma Y, Huang K, Zhang Y, Zhao Q, Winkler CA, An P, Lyu J.** Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, **2016**; 7:27838–27847.
56. **Sinn DH, Lee J, Goo J, Kim K, Gwak GY, Paik YH, Choi MS, Lee JH, Koh KC, Yoo BC, Paik SW.** Hepatocellular carcinoma risk in chronic hepatitis B virus-infected compensated cirrhosis patients with low viral load. *Hepatology*, **2015**; 62:694-701.
57. **Mendy ME, Welzel T, Lesi OA, Hainaut P, Hall AJ, Kuniholm MH, McConkey S, Goedert JJ, Kaye S, Rowland-Jones S, Whittle H, Kirk GD.** Hepatitis B viral load and risk for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in the Gambia, West Africa. *Journal of Viral Hepatitis*, **2010**; 17:115-122.
58. **Chen G, Lin W, Shen F, Iloeje UH, London WT, Evans AA.** Past HBV viral load as predictor of mortality and morbidity from HCC and chronic liver disease in a prospective study. *Am. J. Gastroenterol*, **2006**; 101:1797–1803.
59. **Wu JC, Huang YH, Chau GY, Su C.W, Lai CR, Lee PC, Huo TI, Sheen IJ, Lee SD, Lui WY.** Risk factors for early and late recurrence in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol*, **2009**; 51:890–897.
60. **Lin, C.L. Kao JH.** Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **2015**; 1:5(5).
61. **Parkin DM.** The global health burden of infection-associated cancers in the year . *Cancer J Clin*, **2005**; 55:74–108.
62. **Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, Wang LY, Lu SN, You SL, Chen DS, Liaw YF, Chen CJ.** Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **2008**; 100:1134–1143.
63. **Yin J, Zhang H, Li C, Gao C, He Y, Zhai Y, Zhang P, Xu L, Tan X, Chen J, Cheng S, Schaefer S, Cao G.** Role of hepatitis B virus genotype mixture, subgenotypes C2 and B2 on hepatocellular carcinoma: compared with chronic hepatitis B and asymptomatic carrier state in the same area. *Carcinogenesis*, **2008**; 29:1685–1691.
64. **Chan HL, Wong ML, Hui AY, Hung LC, Chan FK, Sung JJ.** Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients. *J Clin Microbiol*, **2003**; 41:1277–1279.
65. **Chen Y, Yu D, Zhang W, Qiu C, Xiang G, Dai W, Wu S, Wang X.** HBV Subgenotype C2 Infection, A1762T/G1764A Mutations May Contribute To Hepatocellular Carcinoma with Cirrhosis in Southeast China. *Iran J Public Health*, **2012**; 41:10-18.

66. **Malmström S, Eilard A, Larsson SB, Hannoun C, Norkrans G, Lindh M.** Genotype impact on long-term virological outcome of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Virol*, **2012**; 54: 321-326.
67. **Wong GL, Chan HL, Yiu KK, Lai JW, Chan VK, Cheung KK, Wong EW, Wong VW.** Meta-analysis: The association of hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*, **2013**; 37:517-526.
68. **Ghosh S, Mondal RK, Banerjee P, Nandi M, Sarkar S, Das K, Santra A, Banerjee S, Chowdhury A, Datta S.** Tracking the naturally occurring mutations across the full-length genome of hepatitis B virus of genotype D in different phases of chronic e-antigen-negative infection. *Clin Microbiol Infect*, **2012**; 18:412-418.
69. **Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, Ho SY, Belshaw R, Allain JP, Hatzakis A.** Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. *Hepatology*, **2013**; 57:908–916.
70. **Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, Raimondo G.** Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications. *J. Hepatol*, **2014**; 61:408–417.
71. **Yang Y, Sun JW, Zhao LG, Bray F, Xiang, YB.** Quantitative evaluation of hepatitis B virus mutations and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis of prospective studies. *Chin. J. Cancer Res*, **2015**; 27:497–508.
72. **Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH.** AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology*, **2016**; 63:261–283.
73. **Lee JH, Han KH, Lee JM, Park JH, Kim H.S.** Impact of hepatitis B virus (HBV) x gene mutations on hepatocellular carcinoma development in chronic HBV infection. *Clin. Vaccine Immunol*, **2011**; 18:914–921.
74. **Lau CC, Sun T, Ching AK, He M, Li JW, Wong AM.** Viral-human chimeric transcript predisposes risk to liver cancer development and progression. *Cancer Cell*, **2014**; 25:335–349.
75. **Li W, Li M, Liao D, Lu X, Gu X4, Zhang Q, Zhang Z, Li H.** Carboxyl-terminal truncated HBx contributes to invasion and metastasis via deregulating metastasis suppressors in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, **2016**; 7:55110–55127.
76. **Liu S, Koh SSY, Lee CGL.** Hepatitis B Virus X Protein and Hepatocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci*, **2016**; 17:940.
77. **Park NH, Song IH, Chung YH.** Molecular Pathogenesis of Hepatitis-B-virus-associated Hepatocellular Carcinoma. *Gut Liver*. **2007**; 1(2):101-17.
78. **Pang R, Tse E, Poon RT.** Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, **2006**; 240:157-169.
79. **Gao J, Xiong Y, Wang Y, Wang Y, Zheng G, Xu H.** Hepatitis B virus X protein activates notch signaling by its effects on Notch1 and Notch4 in human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol*, **2016**; 48:329–337.
80. **Zhu M, Guo J, Li W, Lu Y, Fu S, Xie X, Xia H, Dong X, Chen Y, Quan M.** Hepatitis B virus protein induces expression of a-fetoprotein and activates PI3K/mTOR signaling pathway in liver cells. *Oncotarget*, **2015**; 6:12196–12208.
81. **Qadri I, Fatima K, Abd LHH.** Hepatitis B virus X protein impedes the DNA repair via its association with transcription factor, TFIIH. *BMC Microbiol*, **2011**; 11:48.

82. **Srisuttee R, Koh SS, Park EH, Cho IR, Min HJ, Jhun BH, Yu DY, Park S, Park DY, Lee MO.** Up-regulation of Foxo4 mediated by hepatitis B virus X protein confers resistance to oxidative stress-induced cell death. *Int. J. Mol. Med*, **2011**; 28:255–260.
83. **Hong Y, Zhou L, Xie H, Zheng S.** Innate immune evasion by hepatitis B virus-mediated downregulation of TRIF. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **2015**; 463:719–725.
84. **Kuo TC, Chao CC.** Hepatitis B virus X protein prevents apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by upregulating SATB1 and HURP expression. *Biochem Pharmacol*, **2010**; 80:1093-1102.
85. **Kong F, You H, Zhao J, Liu W, Hu L, Luo W, Hu W, Tang R, Zheng K.** The enhanced expression of death receptor 5 (DR5) mediated by HBV x protein through NF-1B pathway is associated with cell apoptosis induced by (TNF-a related apoptosis inducing ligand) trail in hepatoma cells. *Viol. J*, **2015**; 12:192.
86. **Ali A, Hafiz HA, Qadri I.** Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, **2014**; 20(30):10238-10248.
87. **Shen L, Zhang X, Hu D, Feng T, Li H, Lu Y, Huang J.** Hepatitis B virus X (HBx) play an anti-apoptosis role in hepatic progenitor cells by activating Wnt/ β -catenin pathway. *Mol. Cell. Biochem*, **2013**; 383:213–222.
88. **Liz J, Esteller M.** LncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. *Biochim. Biophys. Acta*, **2016**; 18(59):169–176.
89. **Sze KM, Chu GK, Lee JM, Ng IO.** C-terminal truncated hepatitis B virus X protein is associated with metastasis and enhances invasiveness by c-Jun/matrix metalloproteinase protein 10 activation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **2013**; 57:131–139.
90. **Shi Y, Wang J, Wang Y, Wang A, Guo H, Wei F, Mehta SR, Espitia S, Smith DM, Liu L.** A novel mutant 10ALA/ARG together with mutant 144SER/ARG of hepatitis B virus X protein involved in hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis in HEPG2 cell lines. *Cancer Lett*, **2016**; 371:285–291.
91. **Horvitz HR, Sulston JE.** Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **1980**; 96 (2):435–454.
92. **Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE.** Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*, *Cell*, **1981**; 24(1):59–69.
93. **Lee R, Feinbaum R, Ambros V,** A short history of a short RNA. *Cell*, **2004**; 116(2):89–92.
94. **Bhaskaran M, Mohan M.** MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol*, **2014**; 51(4):759-74
95. **Ferguson EL, Sternberg PW, Horvitz HR.** A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **1987**; 326 (6110):259–267.
96. **Ruvkun G, Giusto J,** The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch, *Nature*, **1989**; 338 (6213):313–319.
97. **Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G.** The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **2000**; 403 (6772):901–906.
98. **Vella MC, Slack FJ.** *C. elegans* microRNAs. *WormBook*, **2005**; 21:1–9.

99. **Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G.** Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, **2000**; 408 (6808):86–89.
100. **Almeida MI, Reis RM, Calin GA.** MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res*, **2011**; 717(1-2):1-8.
101. **Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN.** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **2003**; 425:415–419.
102. **Acunzo M, Croce CM.** MicroRNA in Cancer and Cachexia--A Mini-Review. *The Journal of Infectious Diseases*. **2015**; 15:212
103. **Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN.** The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*, **2006**; 25:522–532.
104. **Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR.** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, **2003**; 17:3011–3016.
105. **Saraiya AA, Wang CC.** snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathogens*, **2008**; 48(11):1-10.
106. **Sagnelli E, Potenza N, Onorato L, Sagnelli C, Coppola N, Russo A.** Micro-RNAs in hepatitis B virus-related chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*, **2018**; 10(9):558-570.
107. **Xie KL, Zhang YG, Liu J, Zeng Y1, Wu H.** microRNAs associated with HBViInfection and HBV-related HCC. *Theranostics*, **2014**; 4(12):1176-1192.
108. **Su C, Hou Z, Zhang C, Tian Z, Zhang J.** Ectopic expression of microrna-155 enhances innate antiviral immunity against hbv infection in human hepatoma cells. *Virol J*, **2011**; 8:354.
109. **Wang S, Zhang X, Ju Y, Zhao B, Yan X, Hu J, Shi L, Yang L, Ma Z, Chen L, Liu Y, Duan Z, Chen X, Meng S.** MicroRNA-146a feedback suppresses t cell immune function by targeting stat1 in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol*. **2013**; 191:293-301.
110. **Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saïb A, Voinnet O.** A cellular microrna mediates antiviral defense in human cells. *Science*, **2005**; 308:557-560.
111. **Liu N, Zhang J, Jiao T, Li Z, Peng J, Cui Z, Ye X.** Hepatitis b virus inhibits apoptosis of hepatoma cells by sponging mir-15a/16 cluster. *J Virol*. **2013**; 87(24):13370-8
112. **Zhang GL, Li YX, Zheng SQ, Liu M, Li X, Tang H.** Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral Res*, **2010**; 88:169-175.
113. **Chen Y, Shen A, Rider PJ, Yu Y, Wu K, Mu Y, Hao Q, Liu Y, Gong H, Zhu Y, Liu F, Wu J.** A liver-specific microrna binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis b virus and negatively regulates viral gene expression and replication. *FASEB J*, **2011**; 25:4511-4521.
114. **Potenza N, Papa U, Mosca N, Zerbini F, Nobile V, Russo A.** Human microrna hsa-mir-125a-5p interferes with expression of hepatitis b virus surface antigen. *Nucleic Acids Res*, **2011**; 39(12): 5157-5163.
115. **Qiu L, Fan H, Jin W, Zhao B, Wang Y, Ju Y, Chen L, Chen Y, Duan Z, Meng S.** mir-122-induced down-regulation of ho-1 negatively affects mir-122-mediated suppression of HBV. *Biochem Biophys Res Commun*, **2010**; 398(49):771-777.

116. **Kim JW, Lee SH, Park YS, Hwang JH, Jeong SH, Kim N, Lee DH.** Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection. *Intervirology*, **2011**; 54(6):316-325.
117. **Connolly E, Melegari M, Landgraf P, Tchaikovskaya T, Tennant BC, Slagle BL, Rogler LE, Zavolan M, Tuschl T, Rogler CE.** Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. *Am J Pathol*, **2008**; 173(3):856-864.
118. **Gao P1, Wong CC, Tung EK, Lee JM, Wong CM, Ng IO.** Deregulation of microRNA expression occurs early and accumulates in early stages of HBV-associated multistep hepatocarcinogenesis. *J Hepatol*, **2011**; 54(6):1177-1184.
119. **Han H, Sun D, Li W, Shen H, Zhu Y, Li C, Chen Y, Lu L, Li W, Zhang J, Tian Y, Li Y.** A c-myc-microRNA functional feedback loop affects hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, **2013**; 57(6):2378-2389.
120. **Song K, Han C, Zhang J, Lu D, Dash S, Feitelson M, Lim K, Wu T.** Epigenetic regulation of microRNA-122 by peroxisome proliferator activated receptor-gamma and hepatitis B virus x protein in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, **2013**; 58(5):1681-92.
121. **Wang Y, Toh HC, Chow P, Chung AY, Meyers DJ, Cole PA, Ooi LL, Lee CG.** MicroRNA-224 is up-regulated in hepatocellular carcinoma through epigenetic mechanisms. *FASEB J*, **2012**; 26(7):3032-3041.
122. **Longerich T, Mueller MM, Breuhahn K, Schirmacher P, Benner A, Heiss C.** Oncogenetic tree modeling of human hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer*, **2012**; 130(3):575-583.
123. **Chen PJ, Yeh SH, Liu WH, Lin CC, Huang HC, Chen CL, Chen DS, Chen PJ.** Androgen pathway stimulates microRNA-216a transcription to suppress the tumor suppressor in lung cancer-1 gene in early hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, **2012**; 56(2):632-643.
124. **Zhang S, Shan C, Kong G, Du Y, Ye L, Zhang X.** MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF- κ B-inducing kinase (NIK). *Oncogene*, **2012**; 31(31):3607-3620.
125. **Budhu A, Jia HL, Forgues M, Liu CG, Goldstein D, Lam A, Zanetti KA, Ye QH, Qin LX, Croce CM, Tang ZY, Wang XW.** Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **2008**; 47(3):897-907.
126. **Zeng L, Yu J, Huang T, Jia H, Dong Q, He F, Yuan W, Qin L, Li Y, Xie L.** Differential combinatorial regulatory network analysis related to venous metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Genomics*, **2012**; 13(8):14.
127. **Zhao X, Yang Z, Li G, Li D, Zhao Y, Wu Y, Robson SC, He L, Xu Y, Miao R, Zhao H.** The role and clinical implications of microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Sci China Life Sci*, **2012**; 55(10):906-19.
128. **Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, Wang JF, Zhang Z, Lu S, Huang X, Wang Z, Qiu S, Wang X, Yang G, Sun H, Tang Z, Wu Y, Zhu H, Fan J.** Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, **2011**; 29(36):4781-4788.
129. **Li J, Wang Y, Yu W, Chen J, Luo J.** Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance. *Biochem Biophys Res Commun*, **2011**; 406(1):70-73.

130. Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, Huang L, Li H, Tan W, Wang C, Lin D. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog*, **2011**; 50(2):136–142.
131. Barshack I, Meiri E, Rosenwald S, Lebanony D, Bronfeld^a M, Aviel-Ronen S, Rosenblatt K, Charcon SP, Leizerman I, Ezagouri M, Zepeniuk M, Shabes N, Cohen L, Tabak S, Cohen D, Bentwich Z, Rosenfeld N. Differential diagnosis of hepatocellular carcinoma from metastatic tumors in the liver using microRNA expression. *Int J Biochem Cell Biol*, **2010**; 42: 1355–1362.
132. Ji J, Zhao L, Budhu A, Forgues M, Jia HL, Qin LX, Ye QH, Yu J, Shi X, Tang ZY, Wang XW. Let-7g targets collagen type I alpha2 and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, **2010**; 52(5):690–697.
133. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*, **2009**; 10(1):25–34.
134. Muthiah M, Park IK, Cho CS. Nanoparticle-mediated delivery of therapeutic genes: Focus on miRNA therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv*, **2013**; 10(9):1259-1273.
135. Hsu SH, Yu B, Wang X, Lu Y, Schmidt CR, Lee RJ, Lee LJ, Jacob ST, Ghoshal K. Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of sirna and miRNA to murine liver tumor. *Nanomedicine*, **2013**; 9(8):1169-1180.
136. Wang X, Yu B, Ren W, Mo X, Zhou C, He H, Jia H, Wang L, Jacob ST, Lee RJ, Ghoshal K, Lee LJ. Enhanced hepatic delivery of sirna and microRNA using oleic acid based lipid nanoparticle formulations. *J Control Release*, **2013**; 172(3):690-698.
137. Liang GF, Zhu YL, Sun B, Hu FH, Tian T, Li SC, Xiao ZD. PLGA-based gene delivering nanoparticle enhance suppression effect of miRNA in hepg2 cells. *Nanoscale Res Lett*, **2011**; 12(6):447.
138. Li D, Liu X, Lin L, Hou J, Li N, Wang C, Wang P, Zhang Q, Zhang P, Zhou W, Wang Z, Ding G, Zhuang SM, Zheng L, Tao W, Cao X. MicroRNA-99a inhibits hepatocellular carcinoma growth and correlates with prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem*, **2011**; 286(42):36677-36685.
139. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*, **2009**; 137(6):1005-1017.
140. Zhang M, Zhou X, Wang B, Yung BC, Lee LJ, Ghoshal K, Lee RJ. Lactosylated gramicidin-based lipid nanoparticles (lac-gln) for targeted delivery of anti-miR 155 to hepatocellular carcinoma. *J Control Release*, **2013**; 168(3):251-261.
141. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Noda T, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let- 7 family of microRNAs inhibits bcl-xl expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, **2010**; 52(5):698-704.
142. Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov*, **2013**; 12(11):847-865.
143. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin*, **2015**; 65:87–108

144. **Kew MC.** Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathol Biol*, **2010**; 58:273–277.
145. **Zhang B, Han S, Feng B, Chu X, Chen L, Wang R.** Hepatitis B virus X protein-mediated non-coding RNA aberrations in the development of human hepatocellular carcinoma *Exp Mol Med*, **2017**; 49(2):e293
146. **Feng W, Feng Y.** MicroRNAs in neural cell development and brain diseases. *Sci China Life Sci*, **2011**; 54:1103–1112.
147. **Wang L, Yue Y, Wang X, Jin H.** Function and clinical potential of microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. **2015**; 10(6):3345–3353.
148. **Tan YL, Chen WN.** MicroRNAs as therapeutic strategy for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: current status and future prospects. *World J Gastroenterol*, **2014**; 20(20):5973–86.
149. **Bronte F, Bronte G, Fanale D, Caruso S, Bronte E, Bavetta MG, Fiorentino E, Rolfo C, Bazan V, Di Marco V, Russo A.** HepatomiRNoma: The proposal of a new network of targets for diagnosis, prognosis and therapy in hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. **2016**; 97:312–21
150. **Zhang H, Yang Y, Ma M, Qiu Y, Qin J.** Serum miRNA-21, miRNA-153 and miRNA-22 levels were identified as diagnostic biomarkers of patients with hepatocellular carcinoma: a Chinese population-based study. *Int J Clin Exp Pathol*, **2017**; 10(3):3857–3864.
151. **Yoon JS, Kim G, Lee YR, Park SY, Tak WY, Kweon YO, Park JG, Lee HW, Han YS, Ha HT, Chun JM, Jang SY, Hur K.** Clinical significance of microRNA-21 expression in disease progression of patients with hepatocellular carcinoma. *Biomark Med*, **2018**; 12(10):1105–1114.
152. **Guo X, Lv X, Lv X, Ma Y, Chen L, Chen Y.** Circulating miR-21 serves as a serum biomarker for hepatocellular carcinoma and correlated with distant metastasis. *Oncotarget*, **2017**; 8(27):44050–44058.
153. **Fan CG, Wang CM, Tian C. Li L, Sun WS, Li RF, Liu YG.** miR-122 inhibits viral replication and cell proliferation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and targets NDRG3. *Oncol Rep*, **2011**; 26(5):1281–1286.
154. **Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Chen L, Yu X, Zhou X, Gan J.** A serum microRNA panel as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma related with hepatitis B virus. *PLoS One*, **2014**; 9(9):e107986.
155. **Dai M, Li L, Qin X.** Clinical value of miRNA-122 in the diagnosis and prognosis of various types of cancer. *Oncol Lett*, **2019**; 17(4):3919–3929.
156. **Qiao DD, Yang J, Lei XF, Mi GL, Li SL, Li K, Xu CQ, Yang HL.** Expression of microRNA-122 and microRNA-22 in HBV-related liver cancer and the correlation with clinical features. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **2017**; 21(4):742–747.
157. **Balkan A, Gülsen MT, Kaya B.** Serum MicroRNA-26, MicroRNA-122 and MicroRNA-192 expressions in hepatocellular carcinoma. *Acta Medica Mediterranea*, **2017**; 33:165–172.
158. **Cao MQ, You AB, Zhu XD, Zhang W, Zhang YY, Zhang SZ, Zhang KW, Cai H, Shi WK, Li XL, Li KS, Gao DM, Ma DN, Ye BG, Wang CH, Qin CD, Sun HC, Zhang T, Tang ZY.** miR-182-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by repressing FOXO3a. *J Hematol Oncol*, **2018**; 11(1):12.

159. **Riazalhosseini B, Mohamed R, Apalasamy YD, Langmia IM, Mohamed Z.** Circulating microRNA as a marker for predicting liver disease progression in patients with chronic hepatitis B. *Rev Soc Bras Med Trop*, **2017**; 50(2):161-166.
160. **Zhang S, Zhu L, Liu H, Liu S, Zhao N, Wu J, Huang X, Zhang Y, Jin J, Wang D, Zheng Z, Ding X.** Over-Expressions of Serum miR-182-5p, miR-363-3p, and miR-378a-3p serve as Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma. *Mol Biol*, **2016**; 5:1-7.
161. **Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D.** Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol Carcinog*, **2013**; 52 (4), 297–303.
162. **Zhu HR, Huang RZ, Yu XN, Shi X, Bilegsaikhon E, Guo HY, Song GQ, Weng SQ, Dong L, Janssen HLA, Shen XZ, Zhu JM.** Microarray Expression Profiling of microRNAs Reveals Potential Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Tohoku J Exp Med*, **2018**; 245(2):89-98.
163. **Li F, Wang F, Zhu C, Wei Q, Zhang T, Zhou YL.** miR-221 suppression through nanoparticle-based miRNA delivery system for hepatocellular carcinoma therapy and its diagnosis as a potential biomarker. *Int J Nanomedicine*. **2018**; 13:2295-2307.
164. **Yang T, Zheng ZM, Li XN, Wang Y, Geng YF, Bai L, Zhang XB.** miR-223 modulates multidrug resistance via downregulation of ABCB1 in hepatocellular carcinoma cells. *Exp. Biol. Med*, **2013**; 238 (9):1024–1032.
165. **Bhattacharya S, Steele R, Shrivastava S, Chakraborty S, Di Bisceglie AM, Ray RB.** Serum miR-30e and miR-223 as Novel Noninvasive Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Am J Pathol*, **2016**; 186(2):242-7.
166. **Lv Z, Tao Y, Cai X, Zhou X, Li Y.** Cluster of specified microRNAs in tissues and serum as biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, **2018**; 11(2):990-997.
167. **Nayak B, Paul NNS, Acharya SSK, Saraya A.** To study changes in circulatory microRNA expression in hepatocellular carcinoma patients receiving. *J Clin Exp Hepatol*, **2017**; 7:81.
168. **Trung TN, Duong DC, Tong HV, Hien TTT, Hoan PQ, Bang MH, Binh MT, Ky TD, Tung NL, Thinh NT, Sang VV, Thao LTP, Bock CT, Velavan TP, Meyer CG, Song LH, Toan NL.** Optimisation of quantitative miRNA panels to consolidate the diagnostic surveillance of HBV-related hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, **2018**; 13(4).
169. **Shen J, Siegel AB, Remotti H, Wang Q, Santella RM.** Identifying microRNA panels specifically associated with hepatocellular carcinoma and its different etiologies. *Hepatoma Res*, **2016**; 2:151-162.
170. **Thurnherr T, Mah WC, Lei Z, Jin Y, Rozen SG, Lee CG.** Differentially Expressed miRNAs in Hepatocellular Carcinoma Target Genes in the Genetic Information Processing and Metabolism Pathways. *Sci Rep*, **2016**; 6:20065.
171. **Hung CH, Hu TH, Lu SN, Kuo FY, Chen CH, Wang JH, Huang CM, Lee CM, Lin CY, Yen YH, Chiu YC.** Circulating microRNAs as biomarkers for diagnosis of early hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus. *Int J Cancer*, **2016**; 138(3):714-20.
172. **Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, Huang L, Li H, Tan W, Wang C, Lin D.** Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog*, **2011**; 50(2):136-42.

173. **Küçükpara G, Aslan FG, Toka B, Köroğlu M, Altındış M.** HBV ve HCV ilişkili hepatosellüler karsinom ve siroz olgularında mikroRNA. *XIV Ulusal Viral Hepatiti Kongresi*, 2018.
174. **Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, Ulger M, Serin MS, Sezgin O, Altintas E, Tiftik EN.** Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep*, 2014; 41(7):4513-9.
175. **Demirgan R.** Hepatit B virüsü ile infekte hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş hastalarda belirteç olarak mikroRNA'ların değerlendirilmesi. Doktora Tezi, *İstanbul Üniversitesi*, 2019.



8. ÖZGEÇMİŞ

Kayseri’de 1989 yılında doğdu. Liseyi Kocasinan Yabancı Dil Ağırlıklı Süper Lisesi’nde tamamladı. Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2012 yılında mezun olduktan sonra Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında eğitim almaya başladı.

Haziran-Eylül 2013 tarihleri arasında Barcelona Centre for International Health Research’da Mikrobiyoloji Laboratuvar’ında erasmus yaz stajını tamamladı. TÜBİTAK 1507 Kobi-Arge kapsamında 2014-2016 yılları arasında 7140414 no’lu “Basınçlı Buhar Sterilizasyonu Kontrolü için Kapalı Biyolojik İndikatör Geliştirilmesi” projesinde yürütücü oldu.

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda 2015 yılında Doktora eğitimine başladı