



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Doktora Tezi

**HEPATİT B VİRÜSÜ İLE İNFEKTE HEPATOSELULAR
KARSİNOMA TANISI KONULMUŞ HASTALARDA BELİRTEÇ
OLARAK MİKRORNA'LARIN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Recep DEMİRGAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali KARAGÖZ**

**II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat SAYAN**

Nisan, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 24.04.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Ali KARAGÖZ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Kadir TURAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER
İstinye Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Doç. Dr. Bedi PALABIYIK
İstinye Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 34297 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 1649B031402317 başvuru numarası ile TÜBİTAK (BİDEB) Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında yürütülen 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim süresince değerli bilgilerini benimle paylaşan, sevgi ve ilgisini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ali KARAGÖZ'e en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Ercan ARICAN başta olmak üzere çok değerli bilgi birikimini sürekli benimle paylaşan Prof. Dr. Kadir TURAN'a,

Tez örneklerinin temininde bana destek olan ikinci danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Murat SAYAN'a,

Öğrenimim boyunca sürekli destek aldığım hocam ve değerli dostum Dr. Murat PEKMEZ'e,

Lisansüstü eğitimim süresince aldığım dersler aracılığıyla, eğitimime katkıda bulunan İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine,

9 senelik iş hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Yönetim Kurulu Başkanı Alper AKYÜZ, Genel Müdürümüz Dr. Elif AKYÜZ başta olmak üzere çok değerli iş arkadaşlarım İ. Ayşe KANNECİ ALTINIŞIK, Ozan BARAN, Ozancan ULAŞ'a ve tüm Anatolia Genworks ailesine,

Doktora tez çalışmamı BİDEB 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Ayrıca bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan annem Zehra DEMİRGAN, babam GALİP DEMİRGAN'a, ablalarım, yeğenlerime ve ÖNER ailesine ve Çağlayan TOP başta olmak üzere tüm dostlarıma,

Varlıklarından her daim güç aldığım sevgili eşim Aysun DEMİRGAN'a, biricik oğlum Affan Demir DEMİRGAN'a ve henüz aramıza katılmayan ama heyecanla beklediğimiz ailemizin en küçük üyesi kızım bu süreçte bana olan manevi destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nisan 2019

Recep DEMİRGAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvii
SUMMARY	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. HEPATOSELULAR KARSİNOMA.....	4
2.1.1. Patogenezi ve Karsinogenezi.....	5
2.1.2. Hepatoselular Karsinomanın Sebepleri	8
2.1.2.1. Siroz	9
2.1.2.2. Hepatit B Virüsü	9
2.1.2.3. Hepatit C Virüsü	9
2.1.2.4. Alkole Bağlı Karaciğer Hastalıkları.....	10
2.1.2.5. Alkole Bağlı Olmayan Karaciğer Yağlanması	10
2.1.2.6. Aflatoksin	10
2.1.2.7. Obezite	11
2.1.2.8. Tip 2 Diyabet	11
2.1.2.9. Sigara Kullanımı.....	11
2.1.3. Hepatoselular Karsinomanın Moleküler Mekanizması	11
2.1.3.1. Epigenetik Değişiklikler.....	12
2.1.3.2. Gen Mutasyonları	15
2.1.3.3. Kopya Sayısı ve Genin Yeniden Düzenlenmesi.....	17
2.1.4. Karaciğer Karsinogenezinde Diğer Anahtar Sinyal Yolakları	17
2.1.4.1. WNT/ β -katenin Sinyal Yolağı	18
2.1.4.2. Reseptör Tirozin Kinaz Yolağı.....	19
2.1.4.3. VEGF ve Diğer Anjiyogenez Yolakları.....	20
2.1.4.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF β).....	20

2.1.4.5. JAK-STAT Yolağı.....	21
2.1.4.6. Ubikitin Proteozom Yolağı	22
2.1.4.7. HSK'da İmmün Kaçış Mekanizmaları	23
2.1.4.8. HSK'da Kanseri Kökenli Hücreler	23
2.1.5. Hepatoselüler Karsinomada Tanı ve Tedavi	25
2.2. HEPATİT B VİRÜSÜ.....	27
2.2.1. Hepatit B Viral Genomu.....	27
2.2.2. HBV Yaşam Çevrimi, Patogenezi ve Bulaşma Yolları.....	29
2.2.3. Akut ve Kronik HBV Enfeksiyonu	30
2.2.4. HBV Epidemiyolojisi	34
2.2.5. Viral Hepatit Kaynaklı HSK'nın Moleküler Mekanizması.....	36
2.2.6. HBV ile İmmün Sistem İlişkisi	42
2.3. MİKRORNA	45
2.3.1. MikroRNA Biyogenezi	45
2.3.2. MikroRNA Fonksiyonları	46
2.3.3. MiRNA ve Kanser	47
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	49
3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE GRUPLANDIRILMASI.....	49
3.2. NÜKLEİK ASİTLERİN (DNA/RNA) İZOLASYONLARI	49
3.2.1. Total RNA İzolasyonu.....	50
3.2.2. Viral DNA İzolasyonu.....	50
3.2.3. MiRNA İzolasyonu	50
3.3. AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ	51
3.4. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR) ANALİZLERİ	51
3.4.1. HBV DNA GZ-PZR Analizleri.....	52
3.4.2. MiRNA GZ-PZR Analizleri	53
3.4.2.1. MiRNA Normalizasyonu	58
3.4.2.2. MiRNA İç Kontrolü.....	58
3.4.3. GAPDH mRNA'nın GZ-PZR Analizleri	59
3.5. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (REAL TIME PCR) $\Delta\Delta C_T$ ANALİZLERİ	60
3.6. İSTATİKSEL ANALİZLER.....	61
3.7. PATOLOJİK İNCELEMELER	62
4. BULGULAR.....	63

4.1. MİRNA'LARIN İZOLASYON ANALİZLERİ	63
4.1.2. MiRNA Agaroz Jel Elektroforezi Analizleri.....	63
4.2. GERÇEK ZAMANLI PZR ANALİZLERİ	64
4.2.1. HBV DNA Gerçek Zamanlı PZR Analizleri.....	64
4.2.2. MiRNA'ların Gerçek Zamanlı PZR Analizleri	66
4.2.2.1. MiR-16 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri	67
4.2.2.2. MiR-28 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri	68
4.2.2.3. MiR-122 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri	69
4.2.2.4. MiR-221 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri	70
4.2.2.5. MiR-224 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri	71
4.2.2.6. MiR-501 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri	72
4.2.3. MiRNA'lar İçin Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri	73
4.2.3.1. MiR-16 İçin Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri.....	73
4.2.3.2. MiR-28 için Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri.....	74
4.2.3.3. MiR-122 için Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri.....	75
4.2.3.4. MiR-221 için Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri.....	76
4.2.3.5. MiR-224 için Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri.....	77
4.2.3.6. MiR-501 için Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri.....	78
4.2.3. MiRNA İç Kontrolü GZ-PZR Sonuçları (İnternal Kontrol).....	78
4.2.4. MiRNA Normalizasyonu GZ-PZR Analizleri.....	79
4.2.4. HBV DNA ile MiRNA $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri.....	82
4.2.4.1. HBV DNA ile MiR-16 $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri	82
4.2.4.2. HBV DNA ile MiR-28 $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri	83
4.2.4.3. HBV DNA ile MiR-122 $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri	84
4.2.4.4. HBV DNA ile MiR-221 $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri	85
4.2.4.5. HBV DNA ile MiR-224 $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri	86
4.2.4.6. HBV DNA ile MiR-501 $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri	87
4.2.5. Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri	88
4.2.5.1. Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-16 $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri.....	88
4.2.5.2. Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-28 $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri.....	89
4.2.5.3. Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-122 $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri.....	90

4.2.5.4. <i>Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-221 -ΔΔCT Korelasyon Analizleri</i>	91
4.2.5.5. <i>Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-224 -ΔΔCT Korelasyon Analizleri</i>	92
4.2.5.6. <i>Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-501 -ΔΔCT Korelasyon Analizleri</i>	93
4.3. PATOLOJİK İNCELEMELER	95
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	96
KAYNAKLAR.....	107
EKLER.....	120
ÖZGEÇMİŞ.....	123



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Karaciğer kanserinin insidans oranlarının Dünya genelinde coğrafik dağılım.....	4
Şekil 2.2: Hepatoselular karsinoma patogenezi	6
Şekil 2.3: Prekanser lezyonların tarihi	7
Şekil 2.4: İnsanlarda hepatoselular karsinom gelişmesiyle sonuçlanan hücresel lezyonların kronolojik sırası	12
Şekil 2.5: JAK/STAT sitokin sinyalleşme yolağının SOCS ile inaktivasyonu.....	21
Şekil 2.6: MDM2 aktivasyonu ile p53'ün ubiquitinasyonu	22
Şekil 2.7: Tümörögenезis ile ilgili 2 genel model.	24
Şekil 2.8: Hepatik kanser kök hücreleri (CSCs) ile ilişkili sinyal yolları	25
Şekil 2.9: Karaciğer lezyonlarında tanı diyagramı.....	26
Şekil 2.10: HBV genomunun şematik görünümü	28
Şekil 2.11: HBV yaşam çevrimi.....	30
Şekil 2.12: Akut ve Kronik HBV enfeksiyonlarında kanda antijen ve antikor titreleri.....	31
Şekil 2.13: HBeAg pozitif ise tedavinin yönetilmesinde EASL, AASLD ve APASL kılavuzları	33
Şekil 2.14: HBeAg negatif ise tedavinin yönetilmesinde EASL, AASLD ve APASL kılavuzları	34
Şekil 2.15: HBV'nin Dünya genelinde dağılımı	35
Şekil 2.16: HBV ilişkili Hepatoselular karsinoma gelişmesi ve ilerlemesinde virüs, konakçı genetik yatkınlığı ve çevresel faktörlerin ilişkisi.....	37
Şekil 2.17: HBx proteininin hepatoselular karsinoma gelişmesinde moleküler mekanizması	41
Şekil 2.18: HBV'de immün yanıt	44
Şekil 2.19: mikroRNA biyogenezi.....	46
Şekil 3.1: HBV DNA Standart ve negatif kontrol amplifikasyon eğrisi ile standart eğri.....	52

Şekil 3.2: miRNA amplifikasyon reaksiyonları	55
Şekil 3.3: miRNA örnek ve No-PAP kontrolü GZ-PZR ışımaları.....	57
Şekil 3.4: GZ-PZR sonuçlarının yorumlanmasında PFAFFL denklemi.....	61
Şekil 4.1: İzole edilen örneklerin % 2,5'lik Agaroze Jel Sonuçları.....	64
Şekil 4.2: Serum örneklerinin HBV DNA GZ PZR çalışması kantitasyonları (IU/mL).	65
Şekil 4.3: miR-16 - $\Delta\Delta C_t$ ve Deney grubu analizleri).	67
Şekil 4.4: miR-28 - $\Delta\Delta C_t$ ve Deney grubu analizleri).	68
Şekil 4.5: miR-122 - $\Delta\Delta C_t$ ve Deney grubu analizleri.....	69
Şekil 4.6: miR-221 - $\Delta\Delta C_t$ ve Deney grubu analizleri.....	70
Şekil 4.7: miR-224 - $\Delta\Delta C_t$ ve Deney grubu analizleri.....	71
Şekil 4.8: miR-501 - $\Delta\Delta C_t$ ve Deney grubu analizleri.....	72
Şekil 4.9: miR-16 ROC analizi	73
Şekil 4.10: miR-28 ROC analizi	74
Şekil 4.11: miR-122 ROC analizi	75
Şekil 4.12: miR-221 ROC analizi.	76
Şekil 4.13: miR-224 ROC analizi	77
Şekil 4.14: miR-501 ROC analizi.	78
Şekil 4.15: (a) inhibisyon kontrolü olarak kullanılan ath-168a gerçek zamanlı PZR logaritmik artışı, (b) bir örnekte meydana gelen inhibisyon artışı.	79
Şekil 4.16: Normalizasyonda kullanılan 2 snRNA ve 1 mRNA'nın Ct analizi.....	80
Şekil 4.17: snRNA U6 amplifikasyonu ve erime eğrisi analizleri.....	81
Şekil 4.18: miR-16 HBV DNA kantitasyon analizleri.....	82
Şekil 4.19: miR-28 HBV DNA kantitasyon analizleri.....	83
Şekil 4.20: miR-122 HBV DNA kantitasyon analizleri.....	84
Şekil 4.21: miR-221 HBV DNA kantitasyon analizleri.....	85
Şekil 4.22: miR-224 HBV DNA kantitasyon analizleri.....	86
Şekil 4.23: miR-501 HBV DNA kantitasyon analizleri.....	87

Şekil 4.24: miR-16 - $\Delta\Delta$ CT ve lezyon boyutu korelasyon analizi.....	88
Şekil 4.25: miR-28 - $\Delta\Delta$ CT ve lezyon boyutu korelasyon analizi.....	89
Şekil 4.26: miR-122 - $\Delta\Delta$ CT ve lezyon boyutu korelasyon analizi.....	90
Şekil 4.27: miR-221 - $\Delta\Delta$ CT ve lezyon boyutu korelasyon analizi.....	91
Şekil 4.28: miR-224 - $\Delta\Delta$ CT ve lezyon boyutu korelasyon analizi.....	92
Şekil 4.29: miR-501 - $\Delta\Delta$ CT ve lezyon boyutu korelasyon analizi.....	93
Şekil 4.30: Patoloji örneklerinin hematoksilin ve eozin boyama görüntüleri.....	95



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Hepatoselular karsinomanın patogenezinde majör moleküler mekanizmalar.....	8
Tablo 2.2: HBV Anagenotipleri ve Serotipleri.....	36
Tablo 2.3: Yolakların mutasyon frekansları	38
Tablo 2.4: Virüslerin neden olduğu hepatoselular karsinomada mutasyonel değişimler ve etkileri.	39
Tablo 2.5: miRNA'lar ve biyolojik fonksiyonlarından bazıları.	47
Tablo 3.1: Deney örneklerinin gruplandırılması.	49
Tablo 3.2: TBE Tampon İçeriği.	51
Tablo 3.3: Örnek Yükleme Tamponu İçeriği.	51
Tablo 3.4: Bosphore Ultra HBV Quantification/Detection Kit mix örnek çalışma hacimleri.	53
Tablo 3.5: HBV DNA GZ-PZR koşulları	53
Tablo 3.6: miRNA ve primerlerin dizileri.	54
Tablo 3.7: Poli (A) kuyruğu ekleme reaksiyon bileşenleri.....	55
Tablo 3.8: miRNA'ları cDNA'ya çevirmek için kullanılan reaksiyon bileşen ve hacimleri.	56
Tablo 3.9: miRNA'ları çoğaltmak için kullanılan reaksiyon bileşen ve hacimleri.	56
Tablo 3.10: miRNA GZ-PZR koşulları.	56
Tablo 3.11: No-PAP kontrol reaksiyon bileşenleri.....	57
Tablo 3.12: SnRNA U6 primer dizileri.	58
Tablo 3.13: Ath-168a primer dizileri.....	58
Tablo 3.14: GAPDH primerleri.	59
Tablo 3.15: GAPDH gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan reaksiyonun basamakları.....	59

Tablo 3.16: GAPDH GZ-PZR koşulları.	59
Tablo 4.1: HBV DNA log verilerinin IU/mL ve kopya/mL konsantrasyon aralığı ve örnek sayısı.	65
Tablo 4.2: İzole edilen örneklerin miRNA Δ Ct verileri.	66
Tablo 4.3: Deney gruplarının miRNA $-\Delta\Delta$ Ct verileri.	66
Tablo 4.4: İnhibisyon kontrolün kontrol ve deney grupları arasındaki Ct varyasyon verileri.....	79
Tablo 4.5: Normalizasyon için kullanılan 2 farklı miRNA (U6 snRNA, SNORDD44) ve 1 mRNA'nın (GAPDH) Ct varyasyon verileri.	80
Tablo 4.6: Tüm miRNA'lar için lezyon boyutları ile $-\Delta\Delta$ Ct verileri.	94

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrat Derece
Ct	: Eşik Döngüsü
IU	: İnternasyonal Ünite
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ng	: Nanogram
U	: Ünite

Kisaltmalar	Açıklama
AASLD	: Amerika Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği
AFP	: Alfa Fetoprotein
ALP	: Alkalen Fosfotaz
APASL	: Asya Pasifik Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
DDB1	: DNA Hasarı Bağlanma Proteini 1
DN	: Displastik Nodüller
EASL	: Avrupa Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği
EGFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
GAPDH	: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz
HBV	: Hepatit B virüsü
HBeAg	: Hepatit B Zarf Antijeni
HBsAg	: Hepatit B Yüzey Antijeni
HCC	: Hepatoselular Karsinoma
HCV	: Hepatit C virüsü
HDV	: Hepatit Delta Virüsü
HSK	: Hepatoselular Karsinoma

IASL	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
Infα	: İnterferon alfa
JAK	: Janus Kinaz
LncRNA	: Uzun kodlanmayan RNA
MAPK	: Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinazlar
MHC	: Majör Doku Uygunluk Kompleksi
miRNA	: Mikro RNA
MR	: Manyetik Rezonans
NAFLD	: Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH	: Alkole Bağlı Olmayan Steatohepatit
pgRNA	: Pregenomik RNA
piRNA	: Piwi Etkileşimli RNA
PremiRNA	: Prekürsör miRNA
Pri miRNA	: Primer mikro RNA
RISC	: RNA İndükleyici Susturma Kompleksi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SGOT	: Serum Glutamik Oksaloasetik Transaminaz
SGPT	: Serum Glutamik Pirüvik Transaminaz
snRNA/snoRNA	: Küçük Nüklear RNA
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
STAT	: Transkripsiyonun Sinyal İleticileri ile Aktivatörleri
SWI/SNF	: Swictch/Sükroz Fermante Olmayan Protein Kompleksi
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TBE	: Tris Borat EDTA
TERC	: Telomeraz RNA Kompleksi
TERT	: Telomeraz Revers Transkriptaz
TGFβ	: Transform Edici Büyüme Faktörü Beta
TRBP	: Trans Aktivatör RNA Bağlayıcı Protein
USG	: Ultrasonografi
VDAC3	: Voltaj Bağımlı Anyon Seçici Kanal Proteini 3
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü



ÖZET

DOKTORA TEZİ

HEPATİT B VİRÜSÜ İLE İNFEKTE HEPATOSELULAR KARSİNOMA TANISI KONULMUŞ HASTALARDA BELİRTEÇ OLARAK MİKRORNA'LARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Recep DEMİRGAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ali KARAGÖZ

II. Danışman : Prof. Dr. Murat SAYAN

Bu tez çalışmasında, 6 adet (hsa-miR16, hsa-miR-28, hsa-miR-122, hsa-miR-221, hsa-miR-224 ve hsa-miR-501) insan mikroRNA'sının (miRNA) hepatoselüler karsinomada biyobelirteç olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla Türkiye popülasyonunda deney grupları için HBV DNA'sı pozitif ve hepatoselular karsinoma (HSK) negatif bireylerin serumları ile HBV DNA'sı ve HSK'sı pozitif bireylerin serumları ve karaciğer patoloji örnekleri arasındaki ekspresyon farklılıkları Gerçek Zamanlı PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu/ Real Time PCR) ile göreceli olarak kantite (rölatif kantitasyon) edilmiş ve ekspresyon farklılıkları belirlenmiştir. Çalışılan deney gruplarının HBV DNA log (logaritma) analizleri ile bu 6 miRNA'nın ekspresyon analizleri arasındaki ilişki ortaya konulmuştur. Yine bu tez çalışması kapsamında normalizasyon için 1 mRNA ve 2 adet snRNA hem serum hem de doku örneklerinde uygunlukları değerlendirilmiştir. Ayrıca doku örneklerinin lezyon boyutları ile miRNA'ların ekspresyon değişimleri de ortaya konulmuştur.

Gerçekleştirilen Real Time PCR sonuçları ışığında ekspresyondaki değişimler miR-16 için HBV DNA ve HSK pozitif dokuda kontrol grubuna göre 8.3 katlık bir artış; miR-28 için HBV DNA ve HSK pozitif serum ve doku örneklerinde serum için 2.3 ve doku için ise 9.6 katlık bir azalma; miR-122 için kontrol grubuna göre HBV DNA ve HSK pozitif serum ve doku örneklerinde serum için 5.9 ve doku için 6.9 katlık bir azalma yine aynı miRNA için HBV pozitif fakat HSK tanısı konulmamış serum örneklerinde ise 5,4 katlık bir azalma; miR-221 için kontrol grubuna göre HBV DNA ve HSK pozitif dokuda ekspresyonda kontrol grubuna göre 8 katlık bir artış; miR-224 için kontrol grubuna göre HBV DNA ve HSK pozitif serum ve doku örneklerinde serum için 3.3 ve doku için 4.7 katlık bir artış yine aynı miRNA için HBV pozitif fakat HSK tanısı konulmamış serum örneklerinde ise 7.6 katlık bir artış; miR-501 için ise için kontrol grubuna göre HBV DNA ve HSK pozitif serum ve doku örneklerinde serum için 4.2 ve doku için 12.6 katlık bir artış yine aynı miRNA için HBV pozitif fakat HSK tanısı konulmamış serum örneklerinde ise 4.4 katlık bir artış olarak belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen HBV DNA logları ile miRNA'ların ekspresyon korelasyonları arasında 6 miRNA için de anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

miRNA'ların normalizasyonu için 1 adet Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH-referans gen) mRNA'sı ve 2 adet snRNA (küçük nüklear RNA/snRNA U44 ve snRNA U6) verileri değerlendirilmiştir. GAPDH için serumda ortalama eşik döngüsü (Ct) değeri 31.18 ± 5.98 , snRNA U6 için 26.49 ± 1.75 ve snRNA U44 için 25.94 ± 4.3 , dokuda ise GAPDH için 23.83 ± 4.36 , snRNA U6 için 18.10 ± 1.54 ve snRNA U44 için ise 20.41 ± 1.13 olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca aynı 6 miRNA için doku lezyon büyüklükleri ile miRNA ekspresyon değişimlerinin korelasyonu değerlendirilmiştir. Bu analizler ışığında miR-16 ekspresyonlarında 2 cm'den büyük lezyonlarda artış; miR-28 ekspresyonlarında 0.8 cm'den büyük lezyonlarda azalış; miR-122 ekspresyonlarında 3.6 cm'den büyük lezyonlarda azalış; miR-224 ekspresyonlarında 4.2 cm'den büyük lezyonlarda artış; miR-501 ekspresyonlarında 2.1 cm'den büyük lezyonlarda artış saptanmıştır. miR-221 için ise lezyon büyüklüğüne göre ekspresyonda uyumlu bir değişim saptanamamıştır.

Bu sonuçlar ışığında HSK için özellikle serumdan taramalarda miR-28'in biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini, HSK miRNA Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR; rölatif kantitasyon) çalışmalarında snRNA U6'nın normalizasyon için uygun olabileceğini, HBV DNA kantitasyonu ile ilişkisi saptanamayan 6 miRNA'nın 4'ü için (miR-16, miR-28, miR-122 ve miR-224) lezyon büyüklüğüne göre yüksek oranda değişim gösterdiği, miR-501 için ise 2.1 cm ile 14 cm lezyon boyutu arasında yaklaşık 2 katlık bir artış olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışma ışığında miR-28 için gelecekte HSK'nın erken tanısı için non-invaziv bir tarama testinin klinik validasyon aşamasında değerlendirilmesi için ön veri sunduğunu, ayrıca doku lezyon boyutları ile miRNA ekspresyonları arasındaki ilişki üzerine klinik örnek sayısı ve lezyon boyutlarının çeşitlendirilerek gerçekleştirilecek bilimsel çalışmalar sayesinde ilerleyen süreçte bu tip miRNA tarama yöntemlerinin istatistik programlar ile birlikte lezyon boyutu ile ilgili ön bir bilgi dahi sunabileceğini düşündürmektedir.

Nisan 2019, 146 sayfa.

Anahtar kelimeler: Biyobelirteç, Karaciğer kanseri, MikroRNA, miRNA, HSK, Hepatoselular karsinoma, Hepatit B, HBV, hsa-mir-16, hsa-mir-28, hsa-mir-122, hsa-mir-221, hsa-mir-224, hsa-mir-501.

SUMMARY

Ph.D. THESIS

EVALUATION OF MICRORNA'S AS BIOMARKER IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA PATIENTS INFECTED WITH HEPATITIS B VIRUS

Recep DEMİRGAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Ali KARAGÖZ

Co-Supervisor : Prof. Dr. Murat SAYAN

This study investigates the potential use of 6 pre-determined human microRNAs (hsa-mir-16, hsa-mir-28, hsa-miR-122, hsa-miR-221, hsa-mir-224 and hsa-mir-501) as diagnostic biomarkers in hepatocellular carcinoma. In order to evaluate this potential, miRNA expression levels on HBV positive serum samples from subjects without hepatocellular carcinoma (HCC) are compared with HBV positive serum and liver pathology samples from subjects with HCC, using Real-Time PCR and relative quantitation. All patient groups represent the epidemiology in Turkey. The correlation between the expression levels of these 6 miRNAs with HBV DNA log value is evaluated. Two snRNAs and one mRNA were analyzed for normalization in serum and tissue samples within this research. Expression of the given miRNAs were also compared with lesion size on tissue samples.

Real-Time PCR results showed; 8,3 fold increase in mir-16 expression on tissue samples of HBV DNA positive patients with HCC; 2,3 fold decrease in mir-28 expression on serum samples of HBV DNA positive patients with HCC; 9,6 fold decrease in mir-28 expression on tissue samples of HBV DNA positive patients with HCC; 5,9 fold decrease in miR-122 expression on serum samples of HBV-HCC positive patients, 6,9 fold decrease in miR-122 expression on tissue samples of HBV-HCC positive patients, 5,4 fold decrease in miR-122

expression on serum samples of HBV positive patients without HCC, 8 fold increase in miR-221 expression on tissue samples of HBV-HCC positive patients, 3,3 fold increase in miR-224 expression of serum samples of HBV-HCC positive patients, 4,7 fold increase in miR-224 expression on tissue samples of HBV-HCC positive patients, 7,6 fold increase in miR-224 expression on serum samples of HBV positive patients without HCC, 4,2 fold increase in miR-501 expression on serum samples of HBV-HCC positive patients, 12,6 fold increase in miR-501 expression of HBV-HCC positive patients, 4,4 fold increase in miR-501 expression on serum samples of HBV positive patients without HCC diagnosis.

Based on HBV DNA log levels along with the expression values of the pre-determined miRNAs, no significant correlation has been detected.

Data derived from Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH-reference gene) mRNA and two snRNAs (small nuclear RNA/snRNA U44 and snRNA U6) are used for the normalization of relative quantitation results. Average cycle threshold (Ct) values in serum were found to be $31,18 \pm 5,98$ for GAPDH, $26,49 \pm 1,75$ for snRNA U6 and $25,94 \pm 4,3$ for snRNA U44. Average Cycle Threshold (Ct) values in tissue samples were found to be $23,83 \pm 4,36$ for GAPDH, $18,10 \pm 1,54$ for snRNA U6 and $20,41 \pm 1,13$ for snRNA U44.

The correlation between lesion size and the expressions of 6 pre-determined miRNAs is also evaluated. As a result of this analysis, a positive correlation is observed for the expressions of the following miRNAs; miR-16 on lesions larger than 2 cm, miR-224 on lesions larger than 4,2 cm and miR-501 on lesions larger than 2.1 cm. Contrarily, miR-122 and miR-28 expressions were decreased on lesions larger than 3.6 cm and 0.8 cm respectively. miR-122 on samples with a size of 3,6-4,5 cm and miR-224 on samples larger than 4,5 cm in size. Results do not indicate any correlation between the lesion size and the expression of miR-221.

This study indicates that miR-28 can be used as a diagnostic biomarker for HCC especially on serum screening, the use of snRNA U6 is appropriate for normalization in Real-Time PCR (relative quantitation) applications and 4 of these pre-determined miRNAs (miR-16, miR-28, miR-122 and miR-224) show increased expression patterns with different lesion sizes while no such correlation is seen with HBV DNA levels, miR-501 was found to be increased almost 2-fold on lesions with size from 2.1 to 14 cm. As a result of this study, it was concluded that miR-28 provided preliminary data for the evaluation of a non-invasive screening test for the early diagnosis of HCC in the clinical validation phase. The correlation observed between the lesion sizes and miRNA expression suggests that after further scientific studies are carried out by diversifying the number of clinical specimens and lesion sizes, these types of miRNA screening methods may present a preliminary information about the size of the lesion with a statistical analysis software.

April 2019, 146 pages.

Keywords: Biomarker, Liver cancer, Micro RNA, miRNA, HCC, Hepatocellular carcinoma, Hepatitis B, HBV, hsa-mir-16, hsa-mir-28, hsa-mir-122, hsa-mir-221, hsa-mir-224, hsa-mir-501.

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Kanser, hemen hemen insan vücudunun her bölümünü etkileyebilen ve normal olmayan hücrelerin bitişikteki dokularına yayılabilen, ayrıca uzaktaki diğer organlara da sıçrayabilen, yüzlerce tipi ve alt tipi olan bir hastalık grubudur (Hanahan, 2014). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre¹ 2015 yılında Dünya genelinde ölümlerin en önemli ikinci sebebi 8.8 milyon ölüme neden olması (Wang ve diğ., 2016) sebebiyle kanserdir.

Karaciğer, insan vücudunda yer alan en büyük organdır ve bazı işlevleri yerine getirmek için adaptasyon göstermiş birkaç hücre tipinden (hepatositler, sinüzoidal endotelial hücreler, Kupffer hücreleri vb.) oluşmaktadır. Bu hücre tiplerinden hepatositler toplam karaciğer hacminin % 80'ini oluşturmaktadır. Hepatositler; safra sentezi ve salgılanması, protein sentezi, glukoz homeostazisi (dengelenmesi), ilaç ve toksinlerin metabolize edilmesi vb. birçok önemli fonksiyondan sorumludur (Boyer ve diğ., 2012).

Karaciğer kanseri yani hepatoselüler karsinoma (HSK) Dünya genelinde en sık görülen beşinci kanser olmakla birlikte kanserle ilişkili ölümlerde üçüncü sıradadır (Venook ve diğ., 2010). Karaciğerin primer hücrelerinden türevlenmiş kanser türleri arasında HSK % 85-90'ını oluşturmaktadır. HSK'ya sağlıklı karaciğerde neredeyse hiç karşılaşılmazken siroz olan bireylerde fark edilir oranda fazla görülür. HSK'nın en önemli risk faktörü Hepatit B Virüsü (HBV) ve Hepatit C Virüsü (HCV)'dür. Karaciğerde meydana gelen bir hasar (siroz), anabolik steroidlerin (kas geliştiriciler) kullanımı, sigara kullanımı, aflatoksin, alkol nedeniyle meydana gelen karaciğer rahatsızlıkları, obezite ve diyabet virüslerden sonra gelen risk faktörlerindendir (El-Serag ve Rudolph, 2007).

Kronik hepatite doğrudan ve yine siroz gibi en önemli risk faktörünün oluşumunu tetikleyerek dolaylı olarak da sebep olan HBV'nin yapılan epidemiyolojik analizler sonucunda coğrafi olarak endemisitesi ile HSK prevalansı arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Arbuthnot ve

¹ <http://www.who.int/cancer/en/> [Ziyaret Tarihi: 15.02.2019]

Kew, 2001). Hepatit B Viral DNA, insersiyonu sonrasında karaciğer hücrelerinde çoğalmaya başlar ve sonrasında bitişikteki hepatositleri apoptoz veya nekroza sürükler ve bu da sirozla devam eden karaciğer kanseri ile sonuçlanan bir süreci tetikler (Bréchet ve diğ., 2000).

Karaciğer kanserinin tanısı için serumda ALP (alkalen fosfotaz), transaminazlar (SGOT, SGPT) ve AFP (alfa fetoprotein) seviyelerindeki artış taranır. Fakat HSK tanısı konulmuş hastaların bazılarında ALP ve AFP seviyelerinin normal olduğu da çalışmalarda ortaya konulmuştur (Roberts, 2016; Carr ve diğ., 2018). İleri tanı için manyetik rezonans görüntüleme (MR), ultrason ve bilgisayarlı tomografi (BT) ile kitle doğrudan saptanabilse de kesin teşhis karaciğer biyopsisi ile gerçekleştirilir (Bialecki ve Di Bisceglie, 2005). Karaciğer kanseri için erken tanı çok önemli olsa da şu an hali hazırda kullanılan spesifik bir erken tanı yöntemi bulunmamaktadır.

Karaciğer kanseri ile ilgili semptomların ortaya çıkmasının ardından vakaların % 10'u beş yıl kadar yaşamaktadır. Tedavi için küratif (tedavi edici) veya palyatif (küratif olmayan) tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği (AASLD) hastalık ile tedavi için kılavuzu 2010 yılında güncellemiş ve buna göre küratif tedaviler için organ transplantasyonu, cerrahi rezeksiyon ve perkütan ablasyon; palyatif tedaviler için ise transarteriyel embolizasyon, transarteriyel kemoembolizasyon ve sorafenib önerilmektedir. Tedavinin etkisinin artırılmasında erken tanının önemi sürekli vurgulanmaktadır (Llovet ve diğ., 2008; Cheng ve diğ., 2009; Barbare ve diğ., 2009; Forner ve diğ., 2010).

MikroRNA (miRNA)'lar yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda kısa ve kodlanmayan RNA'lardır. MiRNA'lar transkripsiyon sonrası süreçlerde rol oynayarak gen anlatımını düzenler (Bartel, 2018). MiRNA'lar 1993'de keşiflerinin hemen ardından hedef genlerinin gen anlatımını düzenledikleri, hücre büyümesi, farklılaşması, proliferasyonu, apoptoz ve strese cevap gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerde kilit roller oynadıkları anlaşılmıştır (Lee ve diğ., 1993; Macfarlane and Murphy, 2010; Si ve diğ., 2019).

Yeni tedavi yaklaşımlarında miRNA'lar serum ve plazmada taranarak teşhis için biyobelirteç olarak kullanımları değerlendirilmektedir. Özellikle de kanserde erken aşamalarda teşhis için sirkülasyondaki miRNA'ların analizlenmesi çok değerli bilgiler sunmaktadır (Kosaka ve diğ., 2010). Günümüzde bu amaçla gerçekleştirilmiş farklı kanser türlerinde pek çok çalışma

bulunmaktadır (Lu ve diğ., 2005; Lawrie ve diğ., 2007; Mitchell ve diğ., 2008; Rosenfeld ve diğ., 2008; Taylor ve Gercel-Taylor, 2008; Wang ve diğ., 2018).

Erken teşhisin çok önemli olduğu HSK’da serumda belirteç olarak miRNA’ların kullanımı daha önce de çalışılmış ve önemi vurgulanmıştır (Zhang ve diğ., 2017; Moshiri ve diğ., 2018; Rashad ve diğ., 2018). MiRNA’lar birçok hastalığın erken tanısında biyobelirteç olarak tedaviyi yönetmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmalar çoğunlukla klinik örneklerin hastalardan alınıp sonrasında sonuçların raporlandığı servisler olarak hizmet vermektedir (Rosen, 2015).

Bu tezin ana hedefi önceden belirlenmiş 6 miRNA’nın hepatoselular karsinomada serumda biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesidir. Gerçekleştirilen çalışmalar insan serum ve karaciğer biyopsi örneklerinde yürütülmüştür. Tez kapsamında önceden belirlenmiş 6 miRNA’nın ekspresyonları Gerçek Zamanlı PZR ile çalışılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Ayrıca yine bu 6 miRNA’nın HBV DNA kantitasyonu ile korelasyonunun yanında karaciğer kanseri doku lezyon boyutu ile ekspresyon verileri de değerlendirilmiştir. Çalışmada ayrıca normalizasyon için 3 farklı referans gen kullanılmıştır.

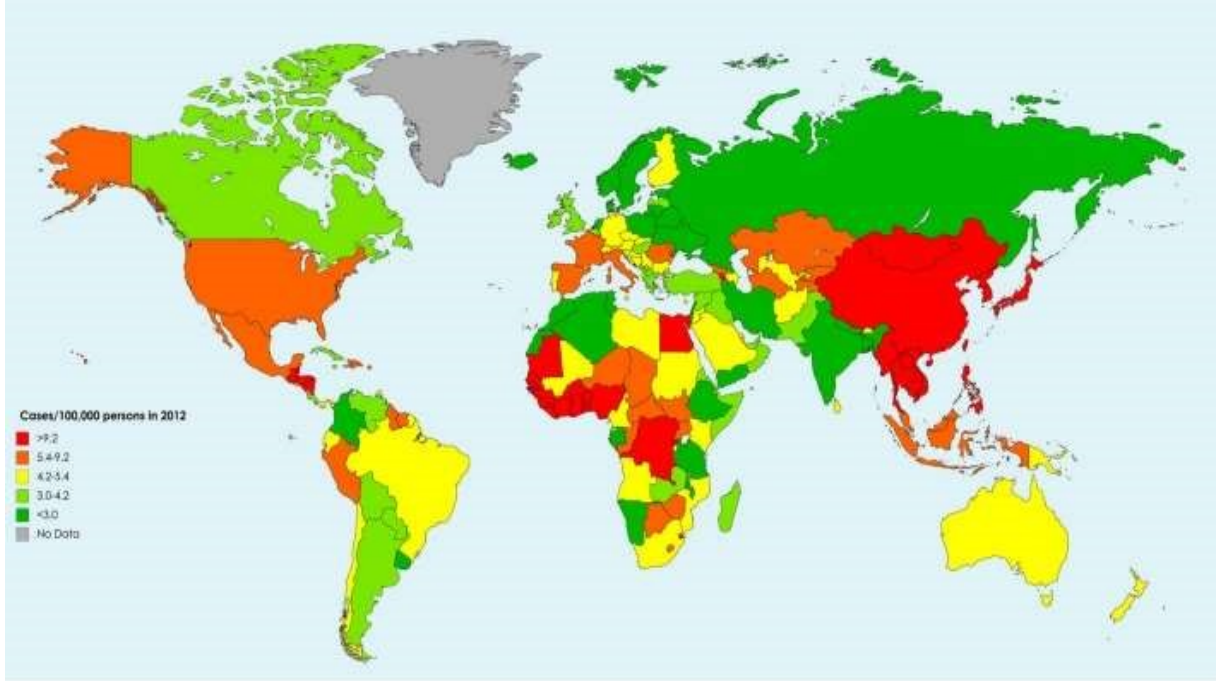
Tezde elde edilen verilerin, HSK’nın erken teşhisinde invaziv müdahalelere gerek kalmadan katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. HEPATOSELULAR KARSİNOMA

Hepatoselular karsinoma (HSK), hepatositlerden köken alan ve karaciğerde en çok rastlanan ayrıca Dünya genelinde erkeklerde beşinci, kadınlarda yedinci ve genelde de altıncı en sık rastlanan karaciğerin primer kanseridir (Ferenci ve diğ., 2010; Llovet ve diğ., 2016). Dünya’da kanser sebepli ölümlerin % 11’ine sebep olur ve akciğer kanserinin ardından kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer alır (Ferlay ve diğ., 2015).

Hastalığın insidans oranları Doğu Asya ve Sahra-altı Afrika’da en yüksek olmakla birlikte (Tang ve diğ., 2017) Amerika Birleşik Devletleri’nde, HSK insidans oranı son otuz yılda üçe katlanmıştır ve HSK kansere bağlı ölümlerin en hızlı yükselen nedeni olmuştur (Hayat ve diğ., 2007; Altekruse ve diğ., 2009).



Şekil 2.1: Karaciğer kanserinin insidans oranlarının Dünya genelinde coğrafik dağılımı (verilen sayılar 100.000 kişide rastlanan vaka sayısıdır) (Tang, 2017).

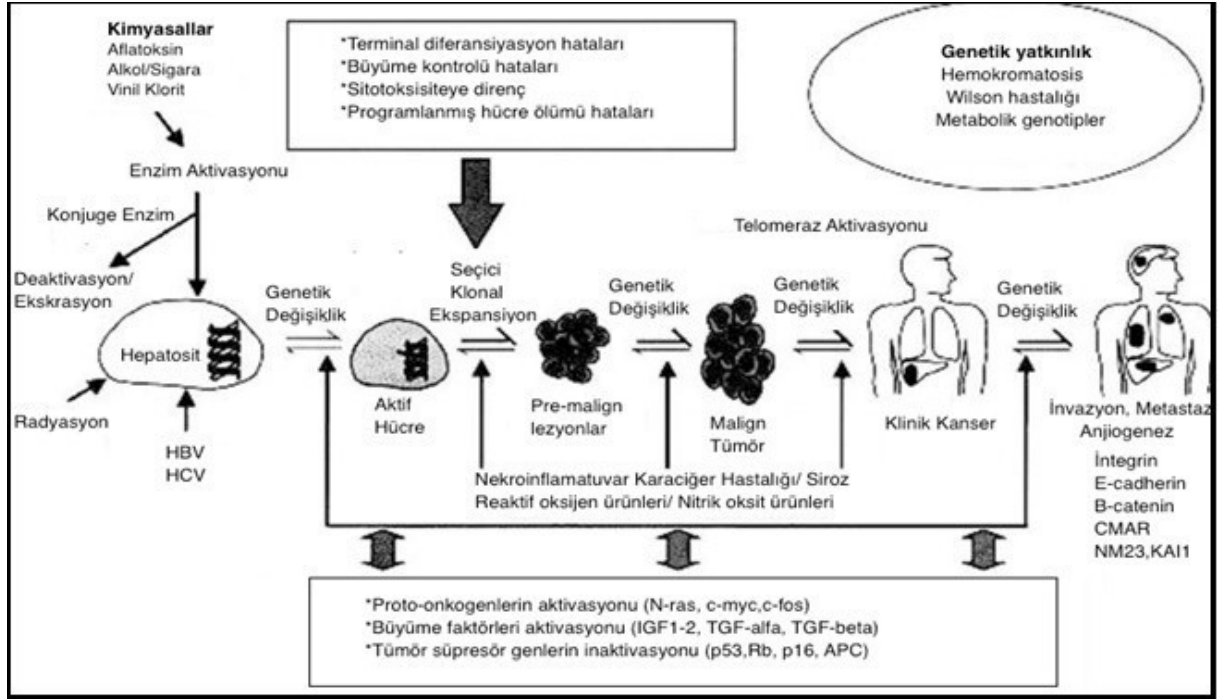
HSK, primer karaciğer kanserlerinin % 90’ını oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’ne bağlı olarak faaliyet gösteren Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARS) tarafından sunulan

istatistiklere göre 2012 yılı verilerine göre Dünya genelinde 782.000 yeni karaciğer kanseri tanısı konulmuş ve yine aynı yılın verilerine göre karaciğer kanserinden yılda 746.000 ölüm gerçekleşmiştir (Gelband ve diğ., 2015). Bu sayı kansere bağlı ölümlerin % 9.1'ini oluşturmaktadır ve kansere bağlı ölümlerin ikinci en sık nedenidir (Wong ve diğ., 2017).

2.1.1. Patogenezi ve Karsinogenezi

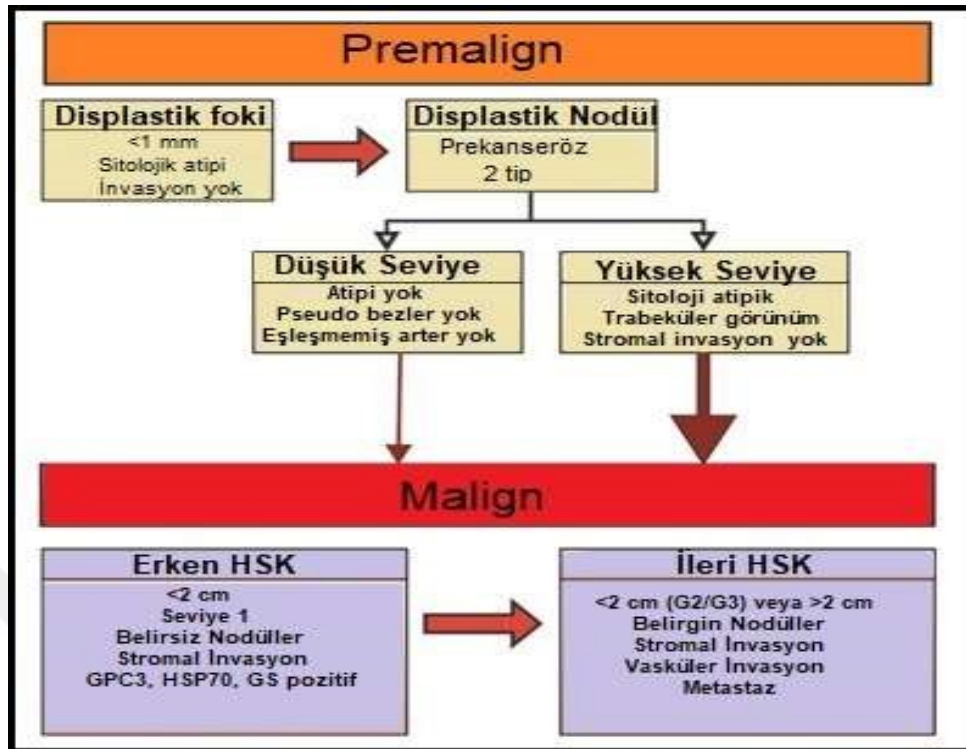
HSK'nın patogenezi çevresel, bulaşıcı, metabolik ve endokrin faktörler olmak üzere dolaylı veya doğrudan bir çok faktöre bağlıdır. Risk faktörlerinden bağımsız olarak öncelikle karaciğerde iltihaplanma (inflamasyon) gerçekleşir. İnflamasyonun ardından karaciğerde nekroz, fibroz ve rejenerasyon meydana gelir. Sirozun en önemli patolojik bulguları arasında fibroz ve rejenarasyon gösterilir (Röcken & Carl-McGrath, 2001).

Kanser oluşumu öncesi hastalığın doğal seyri incelenecek olursa, sirozlu yapısı gelişen hastaların % 80-90'ında HSK gelişir. Normal yapıda hepatositlerden önce malign (habis) olmayan hücrelere ve sonrasında da HSK'ya gelişim çok aşamalı bir süreçtir. Bu aşamalar sırasıyla rejeneratif nodül, düşük dereceli displastik nodül, yüksek dereceli displastik nodül (DN) ve erken HSK gelişimidir. Rejeneratif nodüller 1-1,5 mm arasında düzgün kontürlü, yuvarlak parankim alanlardır. Displastik nodüller ise 1-1,5 cm boyutunda, mikroskobik ve makroskobik olarak zemin dokusundan ayırt edilebilen nodüller şeklindeki lezyonlardır. DN'ler morfolojik özelliklerine göre düşük ve yüksek dereceli DN'ler olarak sınıflandırılırlar. Her iki sınıfında HSK'ya de yüksek dereceli DN'lerin riskleri çok daha fazladır (Şekil 2.2). Özellikle HSK'nın erken evrelerinde yüksek ve düşük dereceli displastik nodüllerin ayrımlarını çok zor olması ve bu ayrımın netleştirilmesi nedeniyle uluslararası bir fikir birliğinin olduğu kılavuzdan faydalanılmaktadır (Kojiro,2009; Obuz 2016).



Şekil 2.2: Hepatoselular karsinoma patogenezi (Severi, 2010).

Displastik nodülleri hepatoselular başlangıçtan ayıran özellik stromal invazyondur (Roskams ve Kojiro, 2010; Park ve Kim., 2011). Erken HSK'da sınırları belirsiz ve 2 cm'den küçük tümör nodülleri vardır. Daha ileri HSK'lar tümör kapsülü ve internal fibrö septa içerir, daha büyük lezyonlar ise (>2cm) ileri, büyük HSK'lar olarak isimlendirilirler (Şekil 2.3) (Roskams ve Kojiro, 2010).



Şekil 2.3: Prekanser lezyonların tarihi (Dhanasekaran, 2016).

HSK'da histolojik sınıflandırılmasına bakılacak olursa doku patolojisi heterojendir. Aynı dokuda çok ileri derecede farklılaşma gösteren hücreler olduğu gibi aynı zamanda çok az farklılaşma gösteren hücreler de mevcut olabilir. HSK'ların, bifenotipik (kombine hepatoselüler karsinoma ve kolanjiokarsinoma) HSK, sirotomimetrik HSK, berrak hücreli HSK, fibrolamellar HSK, lenfosit bakımından zengin HSK, miksoid HSK, sarkomatoid HSK ve steatohepatik HSK gibi çeşitli morfolojik alt tipleri vardır. Bu farklı tiplerin moleküler ve histolojik karakterleri ile ilgili kesin çizilmiş sınırlar olmamakla birlikte yakın zamanda yapılan bazı çalışmalar bu sınırların anlaşılması için ışık tutmaktadır. Protein kinaz A'yı içeren bir kimerik füzyon proteini fibrolamellar HSK'ların % 100'ünde raporlanmıştır (Honeyman ve diğ., 2014; Graham ve diğ., 2015) ve yine HSK'nın bir alt tipinde (kromofob HSK) replikatif yaşlanmanın üstesinden gelmek için özel bir moleküler mekanizma olan telomerlerin alternatif uzaması gösterilmiştir (Wood ve diğ., 2013).

Yeni nesil dizileme teknolojisinin gelişmesi HSK'nın genomik çevresinin anlaşılması ve HSK gelişmesine öncülük eden mutasyonların tanımlanması açısından çok kritik rol oynamıştır.

HSK için yaygın olarak rol oynayan bu spesifik moleküler mekanizmaların (Tablo 2.1) tanımlanması yeni ilaç hedeflerinin geliştirilmesi için önemlidir (Dhanasekaran ve diğ.,2016).

Tablo 2.1: Hepatoselular karsinomanın patogenezinde majör moleküler mekanizmalar.

Genomik Değişimler	Gen Mutasyonları	TERT, Promotör, TP53, CTNNB1,AXIN1,AXIN2, ATM, RPS6KA3, JAK1, IL6R,IL6ST,ARID1,ARID2
	Gen Amplifikasyonları/Delesyonları	CCND1,FGF19,CDKNA2A, CDKNA2B, AXIN1,IRF2, MET
Epigenetik Modifikasyonlar	DNA Metilasyon	GSTP1, E-Kadherin, SOCS-3 CDKNA2,RASSF1A,MGMT
	MikroRNA	miR-155, miR-122, miR-224 miR-1,miR-21
	LncRNA	HULC, HEIH, Dreh, MVIH, HOTAIR, MDIG, LINE1
Büyüme Faktörü Yolağı Değişimleri	Majör Sinyalleşme yolağı	Wnt/ β -Katein, Tirozin kinaz yolakları (EGF,HGF/c-MET, FGF, VEGF), IGF, HIF 1,2, TGF β , Hedgehog

2.1.2. Hepatoselular Karsinomanın Sebepleri

HSK için risk faktörleri çok önemlidir çünkü HSK riskinin belirli bir eşikten yüksek olduğu hastalarda gözetim önerilir. Siroz HSK için en önemli risk faktörüdür. Ülkemizde gerçekleştirilmiş bir çalışmada karaciğer sirozunda % 60'a varan oranlarda viral hepatitlerin (HBV, HCV ve HDV) rol oynadığı gösterilmiştir (Bruix ve Sherman, 2011; Ringehan ve diğ., 2017). Diğer risk faktörleri arasında karaciğer yağlanması, alkol, aflatoksin, obezite, tip 2 diyabet ve sigara kullanımı sayılabilir (Janevska ve diğ., 2015).

2.1.2.1. Siroz

Siroz HSK'nın en önemli risk faktörüdür. Premalign (kansere dönüşme oranı yüksek) bir durum düşünüldüğünde ilk akla gelen kronik inflamasyon ve karaciğer hasarı ile uzun süreli karsinogenezisin işareti olan sirozdur (Theise., 1996; Fattovich ve diğ., 2004). Dünya genelinde HSK'lı vakaların büyük çoğunluğunun altında siroz yatmaktadır (El-Saraq, 2012). Viral hepatite sahip batı popülasyonlarında HSK ile siroz arasında dikkat çekici bir ilişki vardır. HBV hastalarının yaklaşık % 88'i ve HCV hastalarının ise % 93'ünde sirozlu HSK gelişir. Bu nedenle HBV enfeksiyonunun yaygın olduğu alanlar dışında siroz sebepli HSK oluşumu nadirdir (Yang ve diğ., 2011). Siroz, hepatoselüler karsinogenez için en önemli yollardan biri olan kronik inflamasyon ve tekrarlayan karaciğer hasarının bir göstergesidir. İnflamatuvar sitokinler reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretilmesine ve karaciğer fibroz kaskad aktivasyonuna yol açarak hepatosit hücre döngülerini hızlandırır ve bu da genetik değişiklikler ve malign dönüşüm riskini artırır. Bu nedenle siroz risk faktörü ile kronik viral hepatitler iç içe süreçlerdir (Budhu ve diğ., 2006).

2.1.2.2. Hepatit B Virüsü

Hepatit B Virüsü (HBV) ile enfekte kişilerde siroz oluşumu gözlenmeden HSK görülmesi virüsün doğrudan onkojenik olduğunu düşündürmektedir. HBV onkojenik viral proteinler tarafından HSK'nın gelişimini ve genomunun konak genomuna entegrasyonu ile onkogenlerin aktivasyonunu ve tümör supresör genlerin baskılanmasını teşvik eder. Dünya genelinde HSK vakalarının yaklaşık % 50'si HBV enfeksiyonu ile ilişkilidir (Parkin ve diğ., 2006). HBV ile ilişkili HSK vakalarının büyük bir çoğunluğunda (% 70-88) siroz gelişir (El-Saraq 2012; Yang ve diğ., 2011). Ayrıca yapılan çalışmalar HBV viral yükünün miktarı ve HBV genotip C ile enfeksiyonun risk faktörünü artırdığını göstermiştir (Chan ve diğ., 2003; El-Saraq, 2012; Pollicino ve diğ., 2004; Zucman-Rossi ve diğ., 2015).

2.1.2.3. Hepatit C Virüsü

Hepatit C Virüsü (HCV) HSK gelişimini hem doğrudan hem de dolaylı mekanizmalarla tetikler. Dolaylı mekanizmalarda HCV, karsinogenez ve apoptozu teşvik ederek hepatik inflamasyon, fibroze ve sonrasında da hepatositlerin transforme olmalarına neden olur. Doğrudan mekanizmada ise HCV'nin viral protein ekspresyonları enfekte olmuş hücrelerin malignant olarak dönüşmelerini ve mutasyonları teşvik eder (Lemon ve McGivern, 2012). HCV ile

enfekte olmuş hastaların enfekte olmayanlara oranla 15-20 kat daha fazla HSK'ya yakalanma riski olduğu ortaya konulmuştur (El-Saraq, 2012).

2.1.2.4. Alkole Bağlı Karaciğer Hastalıkları

Alkol, toksik bir metabolit olan ve karsinojen olarak bilinen asetaldehite metabolize olur. Sürekli olarak alkol tüketimi karaciğerde oksidatif stresi ve DNA hasarını artıran, DNA tamirinin azalmasına sebep olan kronik inflamasyona yol açar (Turati ve diğ., 2014). Uzun süreli ve aşırı alkol tüketimi hepatokarsinogenez için önemli bir risk faktörü olan alkolik siroza yol açar. Alkol tüketiminin süresinin yanında miktarı da çok önemlidir ve bu konu ile ilgili kadınlarda ve erkeklerde alkol kullanımının güven aralıklarını belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Alkole bağlı karaciğer hasarının ilk evresi karaciğer yağlanmasıdır, bu süreç geri dönüşümü olan bir süreçtir. Bu aşamadan sonra ikinci evre olan alkolün toksik etkisi nedeniyle karaciğer iltihaplanması yani alkolik hepatit gelişir. Bu evre alkolü metabolize eden enzimlerin aktiviteleri kişiden kişiye farklılık gösterdiğinden hiçbir bulgu da göstermeyebilir, bulantı, kusma, ateş, karın ağrısı ve ciddi karaciğer yetmezliği ile ağır bir tabloda da seyredebilir. Alkolik hepatitin ardından eğer alkol tüketimi devam ederse 10 yıl içerisinde alkolik siroz gelişir. Alkol bağımlılarının yaklaşık %15'inde siroz gelişir (Farazi ve DePinho, 2006; Setshedi ve diğ., 2010).

2.1.2.5. Alkole Bağlı Olmayan Karaciğer Yağlanması

Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması NAFLD olarak ifade edilir ve bu süreçte herhangi bir iltihaplanma görünmez fakat karaciğerde yağlanma (steatoz) gözlemlenir. Basit olarak başlayan karaciğer yağlanması ilerlemesi durumunda alkole bağlı olmayan steatohepatite (NASH) ve sonrasında da siroz, karaciğer yetmezliğine ilerleyerek HSK riskini artırmaktadır. İlk aşamalarda morbidite ve mortalite ile ilişkili olmasa da NASH seyretmesi morbidite ve mortalite gelişmesi riskini artırır (De Minicis ve diğ., 2013).

2.1.2.6. Aflatoksin

Aflatoksinler, sıcak ve nemli ortamlarda bolca bulunan mantar türleri (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*) tarafından üretilen karsinojenlerdir (Kew, 2013). Asya ve Afrika'nın bazı bölgelerinde bu mikotoksinler mısır, yer fıstığı ve soya fasülyesi de dahil olmak üzere birçok yiyeceği kirletmektedir. Aflatoksin B1'in yutulması insan ve

hayvanlarda karaciğer hasarına neden olur (Zucman-Rossi ve diğ., 2015). Aflatoksin düzeyi ve HSK gelişimi riski ilişkisi ile ilgili yapılmış birçok çalışma mevcuttur (Ross ve diğ., 1992).

2.1.2.7. Obezite

NAFLD, NASH ve tip 2 diyabet gibi vücut ağırlığı fazlaştığında eşlik eden metabolik değişiklikler HSK gelişimi için risk faktörüdür. Batı toplumlarında HBV ve HCV enfeksiyonu olmayan HSK hastalarının oranı % 30-40 arasındadır. Bu vakaların çoğu obezite ve metabolik sendromlar ile ilişkilidir (El-Seraq, 2012). Aşırı vücut ağırlığının karaciğer kanseri gelişiminde risk faktörü olduğu ve karaciğer kanserinin vücut kütle indeksi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Larsson ve Wolk, 2007; Polesel ve diğ., 2009).

2.1.2.8. Tip 2 Diyabet

HSK'da tip 2 diyabetin mekanizması henüz tüm ayrıntıları ile belirlenemese de insülin direncinin insülin benzeri büyüme faktörünü artırdığı ve bunun da hücre proliferasyonunu artırarak karaciğer kanseri de dahil olmak üzere inflamasyon ve kanser gelişimini artıran proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerini artırdığı düşünülmektedir (Park ve diğ., 2010). Yapılan çalışmalarda kontrol grubuna göre diyabetli hastalarda HSK gelişimi yaklaşık 2 kat fazla olduğu gözlemlenmiştir (Chen ve diğ., 2015).

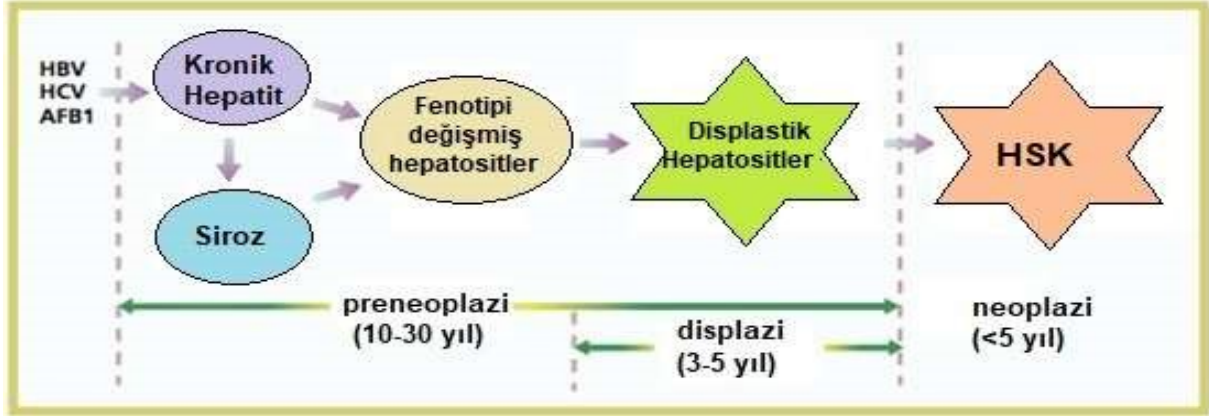
2.1.2.9. Sigara Kullanımı

Tütün dumanı N-nitrosodimetilamin, 4-amino-bifenil, arsenik ve vinil klorür gibi karaciğer için karsinogen olabilecek kimyasalları içerir. Yapılan çalışmalar sigara içen bireylerde hiç sigara içmeyenlere göre yaklaşık olarak 1,5 kat daha fazla HSK gelişimi gözlemlenmiştir (Lee ve diğ., 2009). Ayrıca günlük tütün kullanımının sıklığı ile karaciğer kanseri arasında doz-cevap ilişkisi olduğu da rapor edilmiştir (Akiba ve Hirayama, 1990).

2.1.3. Hepatoselüler Karsinomanın Moleküler Mekanizması

İnsanlarda kronik HBV veya HCV ile enfeksiyon teşhisinden 30 yıl sonra dahi karaciğerde meydana gelen morfolojik değişiklikler sebebiyle HSK gelişebilir. HBV veya HCV ile kronik enfeksiyon gelişmiş hastaların bir kısmında siroz ve HSK rutin olarak oluşur. HSK'dan önce meydana gelen doku lezyonları HSK sırasında gerçekleşen geçici genomik değişimleri

tanımlamak için ön bulgu sağlar. Moleküler patogenezi tanımlamanın ilk adımı neoplazma (doku büyümesi) dır (Buendia, 2002) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: İnsanlarda hepatoselüler karsinom gelişmesiyle sonuçlanan hücresel lezyonların kronolojik sırası (Thorgeirsson & Grisham, 2002).

HSK hem genetik hem de epigenetik bir hastalıktır, HSK gelişirken genlerin ve kromozomların yapılarında bir değişiklik olmazken epigenetik mekanizmalar ile gen ekspresyonları değişebilmektedir. Özellikle yeni nesil dizileme yönteminin avantajları sayesinde son yapılan çalışmalarla tüm genom dizileme, tüm ekzom dizileme, RNA dizileme ve genom çapında metilasyon analizleri HSK'nın genomik altyapısı hakkında önemli bilgiler ortaya çıkarmıştır. Elde edilen sonuçlar HSK'nın çok çeşitlilik gösteren genetik ve epigenetik değişiklikler ile malignite kazandığını göstermektedir (Aravalli ve diğ., 2008).

2.1.3.1. Epigenetik Değişiklikler

Epigenetik, mutasyonlar ve polimorfizmlerin aksine DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan gen anlatımındaki kalıtsal değişikliklerdir. Bunlar DNA sekansında herhangi bir değişiklik meydana getirmezler ve geri döndürülebilir değişimlerdir (Çolakoğlu, 2015). HSK'da anormal DNA metilasyonu, posttransyonel histon modifikasyonları, anormal kodlanmayan RNA (miRNA, lnc-RNA gibi) ekspresyonu ve kromatinin yeniden modellenmesini içeren epigenetik değişimlerle, kanser gelişiminde onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarının artmasına neden olmaktadır (Doğan ve Aktaş, 2016).

DNA Metilasyonu:

DNA'nın metilasyonu, memeli hücrelerinde gen ekspresyonunun kontrolünde önemli rol oynayan epigenetik bir değişimdir. Metilasyonda S-adenozil-metioninden bir metil grubunun sitozin bakiyelerine transferini metiltransferaz katalizler ve böylece 5-metilsitozin meydana gelir. Bu çoğunlukla CpG adalarında gerçekleşir. Genlerin promotör bölgesindeki metile CpG adalarının varlığı bu genlerin ekspresyonularını baskılayabilir. İnsan genomundaki sitozinlerin yaklaşık % 3'ü metillenmiştir (Nafee ve diğ., 2008).

HSK'da birçok gen (tümör baskılayıcı genler, DNA'yı tamir eden genler ve diğer kanser ile ilişkili olan genler) çoğunlukla hipermetilasyona uğramışlardır. Bunlar arasında en çok bilinenleri; RASSF1A, p16 INK4A, p15 INK4B, RB1, GSTP1, SOCS1, ACP, E-Kadherin, Hint1, SOCS3, RIZ1 MGMT, p74'tür (Pogribny ve Rusyn, 2014). Kronik HBV enfeksiyonunun SFRP1, HOXA9, RASSF1A, NAT2, CSPG2, DCC, NTKR2, TNFRSF10C ve GSTP1 genlerini ve p16 geni hipermetile ettiği ve bu genlerin ekspresyonlarında azalmaya sebep olduğu gözlemlenmiştir. HCV ile metilasyon profili HBV kadar aydınlatılmış olmasa da yapılan bazı çalışmalarda HCV ile ilgili de bazı gen bölgeleri (RIK, CHGA, CDKN2A) de bulunmuştur (Feng ve diğ., 2010; Kashyap ve diğ., 2011). Yine HSK için önemli risk faktörlerinden birisi olan alkol kullanımının da RASSF1A, GSTP1, DIO3, STAT5A ve DOK1 genlerinde yüksek metilasyona neden olduğu saptanmıştır (Kashyap ve diğ., 2011; Ma ve diğ., 2014; Doğan ve Aktaş, 2016).

Histon Modifikasyonları:

DNA'ların dağınık bulunmalarını engelleyerek daha az yer kaplamaları için sarılı oldukları protein yapıları histon denir. Histonlar sitozolde sentezlenip nükleozomda birleşir ve sentezlerinin hemen ardından değişikliklere uğrarlar. Histon kuyruğundaki değişimler kromatin yapısının yer yer sıkılaştırılıp gevşetilerek bu yapıya dinamik bir özellik kazandırır. H1/H5, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere 5 ana histon ailesi genlerin regülasyonunda rol oynarlar. Bu histonlarda meydana gelen değişiklikler transkripsiyonun aktivasyonu, inaktivasyonu, kromozom paketlenmesi, DNA tamiri ve birçok farklı süreci etkiler. Histonlarda meydana gelen asetilasyon kromatin yapısında transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için açık bir alan oluşturarak genlerin transkripsiyonunu teşvik eder. Ayrıca bunun tersine yine histon proteinlerde meydana gelen fosforilasyon ise kromozomların yoğunlaşmasını sağlayarak özellikle hücre bölünmesi aşamasında kromozomların kısalıp sıkılaşmasına katkı

sağlamaktadır. Histonlarda meydana gelen diğer bir değişiklik ise metilasyondur. Metilasyon grubu eklenmesi birden fazla (mono-, di-, tri-) gerçekleşebilir ve buna göre adlandırılırlar. Metilasyonda kaç metil grubunun hangi bölgelere eklendiğine göre transkripsiyon aktive veya inhibe olur (Ma ve diğ., 2014; Doğan ve Aktaş, 2016).

HSK'da erken dönemde H3K4me3 ekspresyonunda artış (He ve diğ., 2012), ayrıca hücre hatları ile yapılan çalışmalarda da H3K27 trimetilasyonu ile p16 geninin tamamen sessizleştiği, H3K9'un yüksek dimetilasyonu nedeniyle p16 ve RASSF1a genlerinde baskılandığı rapor edilmiştir (Kondo ve diğ., 2007). Yine hücre hatlarında yapılmış çalışmada hücrel apoptozu indükleyen DDL3'ün HBV ile enfekte olan deney grubunda ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. HBV'nin bu regülasyonu histonların asetilasyonu ile sağladığı düşünülmektedir (Ma ve diğ., 2014; Wu ve diğ., 2018).

Kromatin Yeniden Modellenmesi:

Ökaryotların nükleusunda yüksek derecede paketlenmiş halde bulunan genom, transkripsiyon esnasında kromatin yapının açılıp yeniden düzenlenmesi gerekmektedir. Bu işlevi gerçekleştiren 3 farklı mekanizma vardır (SWI/SNF, ISWI, CHD) (Doğan ve Aktaş, 2016). HSK'da çoğunlukla SWI/SNF protein kompleksinde anormal değişiklikler raporlanmıştır (Endo ve diğ., 2013). Ayrıca yine yapılan çalışmalar HCV ile ilişkili HSK'da rol oynayan ARID2 genini kromatin yeniden modellenmesi ile inaktive ettiği gösterilmiştir (Ma ve diğ., 2014).

Kodlanmayan RNA'lar:

MikroRNA'ların da içinde bulunduğu bu grubun diğer üyeleri uzun kodlanmayan RNA'lar (lnc-RNA) ve PIWI proteini ile ilişkili olan RNA'lar (PIWI-RNA) dır.

Uzun kodlanmayan RNA'lar (lnc-RNA) DNA, RNA veya protein ile ilişkide olup gene özgü transkripsiyonu düzenlerler. Kanserlerin birçok türünde lnc-RNA ekspresyonunda artış gösterilmiştir (Parasramka ve diğ., 2016).

piRNA'lar, PIWI proteinleriyle birlikte ribonükleoproteinleri oluşturur. Transkripsiyonları transpozonlar üzerinde gerçekleşen piRNA'lar sonrasında sitozole geçerek PIWI proteinler ile birleşirler ve bu birleşmenin ardından nükleusa geri dönüp transpozonların susturulmasında görev alırlar. Pek çok kanser türünde ekspresyonları artan piRNA'lar tümör baskılayıcı genlerin

mRNA'larını degrade ederler. Ayrıca onkogenlerin transkripsiyonunun artması da piRNA'ların düşük seviyede ekspresyonları ile gerçekleşmektedir (Ma ve diğ., 2014).

2.1.3.2. Gen Mutasyonları

Bazı spesifik genlerdeki somatik mutasyonlar karsinogeneziste iyi bilinen nedenlerdendir. Diğer solid tümörlere göre cilt ve akciğer kanseri gibi HSK da genom başına en yüksek mutasyon oranını (20-100 arası) içerir (Li ve Mao, 2013). Spesifik mutasyonların oluşmasında karaciğer kanserinin etiolojisi büyük önem taşır. Örneğin HBV replike olurken yüksek mutasyon frekansına sahiptir ve HBV revers transkriptaz enziminin hatayı düzeltme (proofreading) özelliği olmadığı için bu mutasyonlar kalıcı olur. Benzer şekilde HSK için bir risk faktörü olan HCV, HBV'nin aksine konakçı genomuna dahil olmaz fakat çift iplikli DNA'da kırılmalar oluşturarak mutasyon frekansını artırabilir, bu tip mutasyonlar BCL6, TP53 ve CTNNB1 gibi genlerde artmaktadır (Tornesello ve diğ., 2013; Ma ve diğ., 2014).

Telomeraz Promoter Mutasyonları:

Kromozomların uçlarında bulunup onları uçtan uca füzyondan, nükleaz ve ligazlardan koruyan telomerazlar, telomeraz revers transkriptaz (TERT) ve telomeraz RNA komponenti (TERC) protein bileşenlerinden oluşurlar. Telomer DNA dizileri telomerazlar tarafından sentezlenerek kromozomların sonlarına eklenir ve telomer uzunluğu korunmuş olur. Olgun hücrelerde telomeraz ekspresyonu baskılanır ve DNA polimeraz hücre bölünmesi sırasında kromozomların uçlarını tam olarak replike edemezler, bu nedenle telomerlerin boyları giderek kısalır. Yüksek hücre bölünme döngüsünün olduğu kronik karaciğer hasarında telomerlerin kısalması belirginleşir. Telomerlerin belirli kritik noktanın ötesinde kısalması sonucunda apoptoz veya hücresel yaşlanma ile sonuçlanan bir DNA hasar programının aktivasyonuna yol açar ve bu da karaciğer fibrozisin gelişimini tetikleyerek karaciğerin yaşlanmasına neden olur. Ayrıca TERC ve TERT genlerinde de meydana gelebilecek genetik değişimler telomeraz kısalması ile sinerjik etki oluşturarak fibroz ve siroz gelişimini daha da kuvvetlendirir (Hartmann ve diğ., 2011). Gerçekleşen telomeraz kısalması, kromozom instabilitesine neden olur. Telomeraz ekspresyonun veya alternatif telomeraz aktivasyon mekanizmaları ile telomerik DNA'nın stabilizasyonu ve bu da hücrelerin sürekli olarak bölünmesini sağlayabilir (Stewart ve Weinberg, 2000). TERT promotör bölgesindeki mutasyonlar HSK'da en yaygın görülen mutasyonlardır ve telomeraz aktivasyonunda bu mutasyonlar önemli sıklık göstermektedirler. TERT promotör bölgesi mutasyonu HSK'nın % 30-60'ında görülür. HSK hastalarının %

59'unda bulunan TERT promotör bölgesi mutasyonları aynı zamanda % 25 sıklıkla sirotik preneoplastik lezyonlarda da görünmektedir. HBV ile ilişkili HSK'da TERT promotör bölgesi mutasyonları çok daha az görünmektedir. Ayrıca HSK için spesifik özelliklerden bir tanesi de telomeraz reaktivasyonudur. HSK'da telomeraz reaktivasyonu TERT ve TERC ekspresyonlarının artışı ile ilişkilidir. Kanserli dokuların çevresinde yer alan kanser olmayan dokularda telomeraz aktivitesi çok düşük seviyededir veya yoktur. Fakat HSK sürecinde telomeraz aktivasyonuna rastlanır ve telomerazların reaktivasyonu HSK ile karakterizedir (Satyanarayanan ve diğ., 2004; Ma ve diğ., 2014; Mukaida ve Nakamoto, 2018).

TP53 Yolağı Mutasyonları:

TP53 en iyi bilinen tümör supresör gendir ve düşük p53 seviyesi veya p53 mutasyonlarının birçok kanser türü ile ilişkili olduğu bulunmuştur. P53 normalde apoptozu teşvik ve hücre döngüsünü bloke eder, bu nedenle p53 geninde inaktive edici mutasyonlar onkogenik yolları aktive eden diğer karsinojenlere daha duyarlı hale getirebilir ve çok daha agresif bir HSK fenotipi gelişmesine yatkınlık oluşturabilir. HSK'da p53 genindeki mutasyon sıklığı altta yatan etiyojiye bağlı olarak % 18-50 arasındadır ve p53 mutasyonlarının coğrafik bölgelere göre gösterdiği değişimler, hepatoselüler karsinoma etiyojisindeki coğrafik farklılıkları yansıtır. Özellikle aflatoksin (AFB1) maruziyeti p53 geninde 249. kodonda spesifik bir mutasyona neden olduğu raporlanmıştır ve bu mutasyon diğer mutasyonlar için başlatıcı olduğu kabul edilmiştir. HSK'nın teşvik edilmesinde aflatoksin maruziyeti ile kronik HBV enfeksiyonu arasında güçlü bir epidemiyolojik sinerji vardır ve hepatit B ile enfekte hastalarda hepatit B X (HBx)'in ekspresyonu AFB1 maruziyetine takiben G/C'nin T/A'ya transversiyonunun yaklaşık 2 kat artması ile ilişkilidir (Özdemir ve diğ., 2010; Mukaida ve Nakamoto, 2018).

Diğer Yaygın Somatik Mutasyonlar ve HSK'da HBV İntegrasyonu:

HBV'nin konakçı genoma integre olduğu ve hepatokarsinogenezi tetiklediği bilinmektedir (37). HBV integrasyonu ile ilgili hedefler; TERT, MLL4, RAR β , CCNE1, Siklin A2, FN1, ROCK1, SENP5, ANGPT1, PDGF reseptörleri ve kalsiyum sinyal yolları ile ilişki genler, ribozomal protein genleri, EGFR ve mevalonat kinaz karboksipeptidazdır. Bu entgrasyonların bazılarının doğrudan veya dolaylı olarak HSK'nın patolojik rollerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Örneğin MLL4 epigenetik modifikasyonlarda rol oynayan bir histon metil transferazı kodlar. Ayrıca yine HBV'nin spesifik genlere integrasyonu gen ekspresyonunu değiştirir. Yapılan bir çalışmada HBV genomunun integrasyonu sonucunda TERT, MLL4 ve

CCNE1 genlerinin çok daha yüksek eksprese olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte konak hücreye HBV integrasyonu bazı delesyon ve translokasyonlar ile sonuçlanabilir ve bu da kromozomal kararsızlığı artırır (Hai ve diğ., 2014; Thomas ve diğ., 2017).

2.1.3.3. Kopya Sayısı ve Genin Yeniden Düzenlenmesi

Kopya sayısı varyasyonları kromozomun küçük veya büyük bölümlerinde meydana gelen genomik DNA'nın artışına veya kaybolmasına neden olan genomdaki yapısal değişikliklerdir. Bu tür yapısal varyasyonlar, onkogenlerin ekspresyon veya aktivasyonunun artması ve tümör baskılayıcılarının ekspresyonunun veya inaktivasyonunun azalmasıyla karsinogenezi destekler. Fokal delesyonlar (özellikle CDKN2A, CDKN2B, AXIN1 ve IRF2 genlerinde) HSK'ların % 40'ında görülür. Başka bir çalışmada 286 HSK hastasının 29'unda tekrarlanan bölgeler, 22'sinde ise delesyonlar tanımlanmıştır. Genellikle kopya sayısı varyasyonları ile ilgili genler CCND1, MET, CDKN2A ve CDKN2B'i içerir. Yapılan bazı çalışmalarda kopya sayısı varyasyonlarının önemli sayıda olması HSK'da öncü genler olarak tanımlanmıştır. Bu varyasyonların bazıları patojenik mekanizmalar için ayırt edici olarak gösterilmiştir. Örneğin bazı HSK'larda TERT bölgesinde fokal çoğalma ile TERT aktive olur, diğer bir mekanizma ise AXIN1 genindeki delesyondur. Bu Wnt/ β -katenin yolağının aktivasyonuna aracılık eder (Pepe ve diğ., 2018).

Karsinogeneze katkıda bulunan somatik varyasyonun başka bir formu, kromozom translokasyonu, inversiyon veya delesyon ile iki genin füzyonu ile sonuçlanabilen kromozomal yeniden düzenlemelerdir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar bu tip füzyonların fibrolamellar HSK'da da olduğu tanımlanmıştır. Fibrolamellar HSK genellikle gençlerde görülen, sirotik olmayan ve ayrı bir morfolojiye sahip bir HSK'dır. Kromozom 19'da gerçekleşen yaklaşık 400 kilobazlık bir delesyon ile PRKACA ile füzyonu sonucunda bir kimerik RNA oluşur. Bu fibrolamellar HSK'ların hepsinde görülen bir füzyondur (Honeyman ve diğ., 2014; Graham, ve diğ., 2015).

2.1.4. Karaciğer Karsinogenezinde Diğer Anahtar Sinyal Yolakları

Kanser oluşumunda birçok sinyal yolağında değişimler meydana gelir ve HSK'da bazı spesifik yolakların bozulduğu gözlemlenmiştir. Kronik olarak viral bir enfeksiyona ve hepatoksik bir ajana maruz kalındığında karaciğer dokularında meydana gelen değişimler sonucunda bir dizi hücrel sinyal yolağında artış gözlenir. Bunlardan bazıları büyüme faktörleri

sinyalizasyonunda (IGF, EGF, PDGF, FGF ve HGF/MET (hepatosit büyüme faktörü), hücre farklılaşması (WNT, Hedgehog ve Notch yolakları) ve anjiyogeneze ile ilişkili (VEGF, FGF) yolaklardır. Bu yolaklardan en çok değişim gösterenleri ve HSK ilaç tedavilerinde en yaygın olarak hedeflenen mekanizmalar WNT/ β -katenin sinyal yolağı, reseptör tirozin kinaz yolağı, VEGF ve diğer anjiyogeneze yolakları, TGF β , JAK-STAT yolağı, Ubikitin proteozom yolağıdır (Ding ve Wang, 2017).

2.1.4.1. WNT/ β -katenin Sinyal Yolağı

WNT/ β -katenin sinyal yolağı embriyogenezis, farklılaşma, hücre proliferasyonu, tümör oluşumunda rol oynar ve HSK'da en sık rastlanan yolaklardan birisidir. Şimdiye kadar 19 Wnt ligand ve bunların bağlandığı 10 transmembran kıvrımlı reseptör tanımlanmıştır, bunlar kanonik (β -katenin bağımlı) veya kanonik olmayan (β -katenin bağımsız) Wnt yolağını aktive ederler. Kanonik Wnt sinyal yolağının aktivasyonu sitoplazmada β -katenin birikmesi ve nükleusa translokasyonu ile sonuçlanır, böylece TCF/LEF transkripsiyon faktörüne bağlanıp diğer hedef genleri aktive eder. HSK'nın % 50'den fazlasında WNT/ β -katenin sinyal yolağının gen mutasyonları ile aktive olduğu görülmüştür. En çok görülen β -katenin stabilizasyonu ile sonuçlanan CTNNB1 mutasyonudur. Buna ek olarak AXIN1 ve AXIN'deki mutasyonlar hem Wnt yolağının negatif düzenleyicilerini hem de bir tümör supresör gen olan APC (Adenomatous Poliposis Coli)'nin inaktivasyonuna neden olarak Wnt yolağını aktive eder. β -katenin CTNNB1 mutasyonu ile Wnt/ β -katenin yolağını aktive ederek gelişen HSK ile CTNNB1 mutasyonu içermeyen HSK'lar birbirlerinden farklıdır. CTNNB1 mutasyonu olmadan Wnt/ β -katenin yolağı ile aktive olan HSK'lar HBV ile enfekte hastalarda rastlanır ve bu kişilerde daha fazla kromozom instabilitesi ve agresif fenotip görülür. Bunun aksine CTNNB1 mutasyonu ile gerçekleşen HSK düşük dereceli tümörlerdir ve prognozu daha iyidir (Pez ve diğ., 2013; Ding ve Wang, 2017).

Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktifleşmesi için pek çok mekanizma vardır. CTNNB1 mutasyonları varlığında Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktifleşmesi TGF β ile çapraz reaksiyon gösterip bu yolağı da aktive eder. Wnt ligandlarının veya kıvrımlı reseptörlerin fazla eksprese olmaları ve sentezlenen kıvrımlı proteinlerin epigenetik değişimleri HSK'da Wnt yolağını aktive eder (Hoshida ve diğ., 2009).

2.1.4.2. *Reseptör Tirozin Kinaz Yolağı*

HSK vakalarının yaklaşık yarısında, reseptör tirozin kinaz aktivasyonu Ras-mitojen ile aktive edilmiş protein kinazı (MAPK veya kinaz ile regüle edilmiş ekstrasellüler sinyalleşme veya ERK) ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PIK3)-Akt kinaz sinyal yolağını indükler (Villanueva ve diğ., 2007). Bazı büyüme faktörü tirozin kinaz reseptörlerinin (EGFR, FGFR, HGFR/c-MET, VEGFR), kök hücre büyüme faktörü reseptörü (c-kit) ligand bağlanması ve fosforilasyonu MAPK ve PIK3 yollarının aktive olmasını sağlar. Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) yollarının aktivasyonu proto-onkogen cFos ve hücre proliferasyonunu indükleyen AP-1/c-Jun transkripsiyon faktörünü aktive eder. İnsulin veya IGF reseptörleri aracılığıyla PI3K-Akt kinaz sinyal yolağının aktivasyonu sonucunda HSK olgularının yaklaşık % 40-50'sinde karsinogenezi teşvik eden rapamisin (mTOR) yolağının memelilerdeki hedefleri bozulur. Bu yolak mutasyon veya epigenetik susturma yoluyla tümör supresör geni PTEN'in işlev kaybından dolayı PI3K'nın konstitütif aktivasyonu ile disregüle edilebilir. Günümüzde halen ilerlemiş HSK için onaylanmış tek tedavi olan sorafenib, kısmen RAS/MEK/ERK yolağını bloke eder. HSK patogenezinde EGFR mutasyonların rolü az olmasına rağmen EGFR yolağı HSK başlangıcında önemli rol oynar çünkü EGFR genindeki polimorfizm (SNP rs44449030) (G/C vs A/A) sirozda HSK riskini dört kat artırmaktadır. HGF-MET yolağı dikkat çeken başka bir reseptör tirozin kinaz yolağıdır. MET gen ekspresyonu HSK'da vasküler invazyon ve zayıf prognoz ile ilişkilidir ve yapılan çalışmada sorafenib kullanan hastalarda plazmada yüksek HGF seviyesinin kötü sağ kalım ile korele olduğu bulunmuştur. FGF ailesinin 4 adet FGF reseptörleri (FGFR1-4) ile etkileşime giren 23 üyesi vardır, hepatositlerde FGFR4 en çok eksprese edilen reseptördür. FGF19 ligandı, FGFR4'e bağlanır ve safra asidi sentezi ve hepatosit proliferasyonunu düzenler. Son yapılan çalışmalar FGF19-FGFR4 yolağının aktivasyonunun HSK büyüklüğünde anahtar rol oynadığını ve bu potansiyel terapötik bir hedef olduğunu ortaya koymuştur (Dhanasekaran ve diğ., 2015; Du ve diğ., 2016).

Bir dizi reseptör tirozin kinaz ko-reseptör olarak heparan sülfat kullanır ve hücre yüzeyinde veya ekstrasellüler matriksindeki heparan sülfat, heparan sülfat bağlayıcı ligandlar için bir depolama veya konsantrasyon alanı olarak işlev görebilir. SULF1 ve SULF2 heparan sülfat bağlayıcı reseptör tirozin ligandları için heparan sülfatın afinitesi üzerinde etki göstererek HSK karsinogenezinin ve tümör oluşumunu modüle ettiği gösterilmiştir. Potansiyel anti-kanser

ajanlarının geliştirilmesi için sülfataz inhibitörleri yeni hedeflerdendir (Dhanasekaran ve diğ., 2015).

2.1.4.3. VEGF ve Diğer Anjiyogenez Yolakları

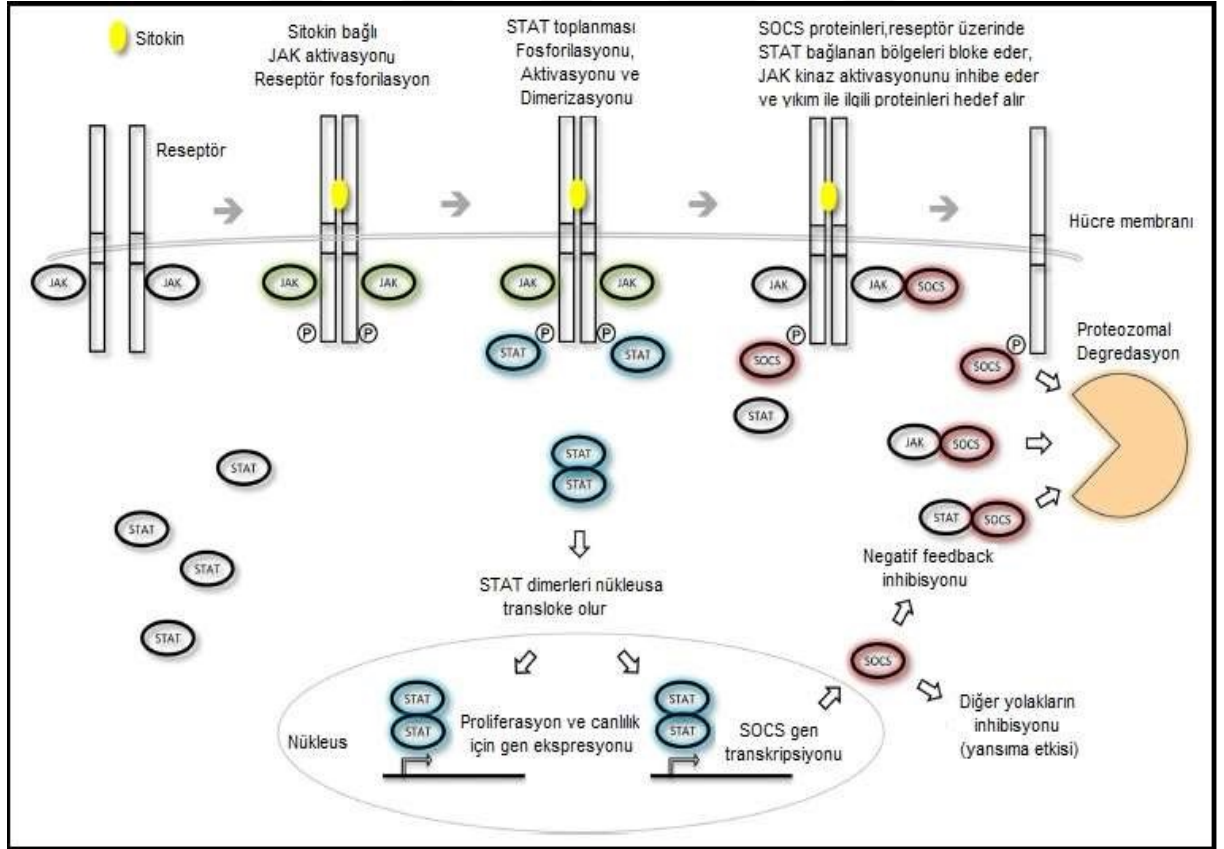
HSK oldukça vasküler bir tümördür ve anjiyogenez (yeni damar oluşumu) bu tümör için dominant bir özelliktir, bu tümörlerin ana kan kaynağı hepatik arterlerdir. VEGF ve anjiyopoietinler HSK'da neoanjiyogenezin desteklenmesi ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynar. VEGF gibi büyüme faktörlerinin anjiyogenik etkilerini inhibe eden sorafenib ve transarteriyel kemoembolizasyon (TACE) gibi tümöre damar vasıtasıyla gelen kaynağı bloke etmeye yarayan teröpatik stratejiler geliştirilmiştir. Zengin damarlaşmaya rağmen tümörün odak bölgelerinde kapilerizasyon ve olgunlaşmamış damar yapısı sebebiyle hipoksi görülür. HSK'da hipoksi sırasıyla hipoksi uyarıcı faktörler 1 ve 2' (HIF1 ve 2) gibi büyüme faktörlerini indükler ve IGF'ler hipoksi duyarlı genlerin aktivasyonu ile tümör anjiyogenezini teşvik edip tümör progresyonu ve metastaza öncülük eder. HIF'ler HSK'ya karşı kemo ve radyo direnç neden oldukları için transarteriyel tedavilerin başarısız olmasına yol açarlar, bu nedenle HIF'lerin aşırı ekspresyonları zayıf prognoz ile ilişkilidir (Dhanasekaran ve diğ., 2015).

2.1.4.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGFβ)

TGFβ'nin kanserde ikili rol oynadığı uzun süredir bilinmektedir. Kanser başlangıcının erken safhalarında hücrel büyüme baskılama ve daha ileri kanser aşamalarında da invaziliği ve anjiyogenezi teşvik etme yeteneği vardır. Yapılan bir çalışmada transkriptom analizleri kullanılmış ve erken ve geç TGFβ özellikleri araştırılmıştır, bu çalışma sonucunda yaşam süresinin kısaldığı vakalarda geç TGFβ karşılaşılmıştır. Ayrıca geç TGFβ duyarlı olan genleri eksprese eden tümörler invaziv fenotip gösterirler ve tümörün nüksünü artırır. HSK'nın geç safhalarında TGFβ tümör metastazında anahtar bir mekanizma olan EMT'yi teşvik ederek kötü prognoza sebep olur. HSK'ların yaygın olarak tanımlanan bir transkriptomik sınıflandırılmasında alt grup olan S1 WNT yolağını ile ilişkilidir ve bu yolda TGFβ aktivasyonu ile indüklenir. Bu veriler ışığında TGFβ önemli bir ilaç hedefi olmuştur. Son yıllarda gerçekleştirilen bir çalışmada heparan sülfat sülfatazların TGFβ yolağını aktive ederek HSK'yı teşvik ettiği gösterilmiştir (Dhanasekaran ve diğ., 2015).

2.1.4.5. JAK-STAT Yolağı

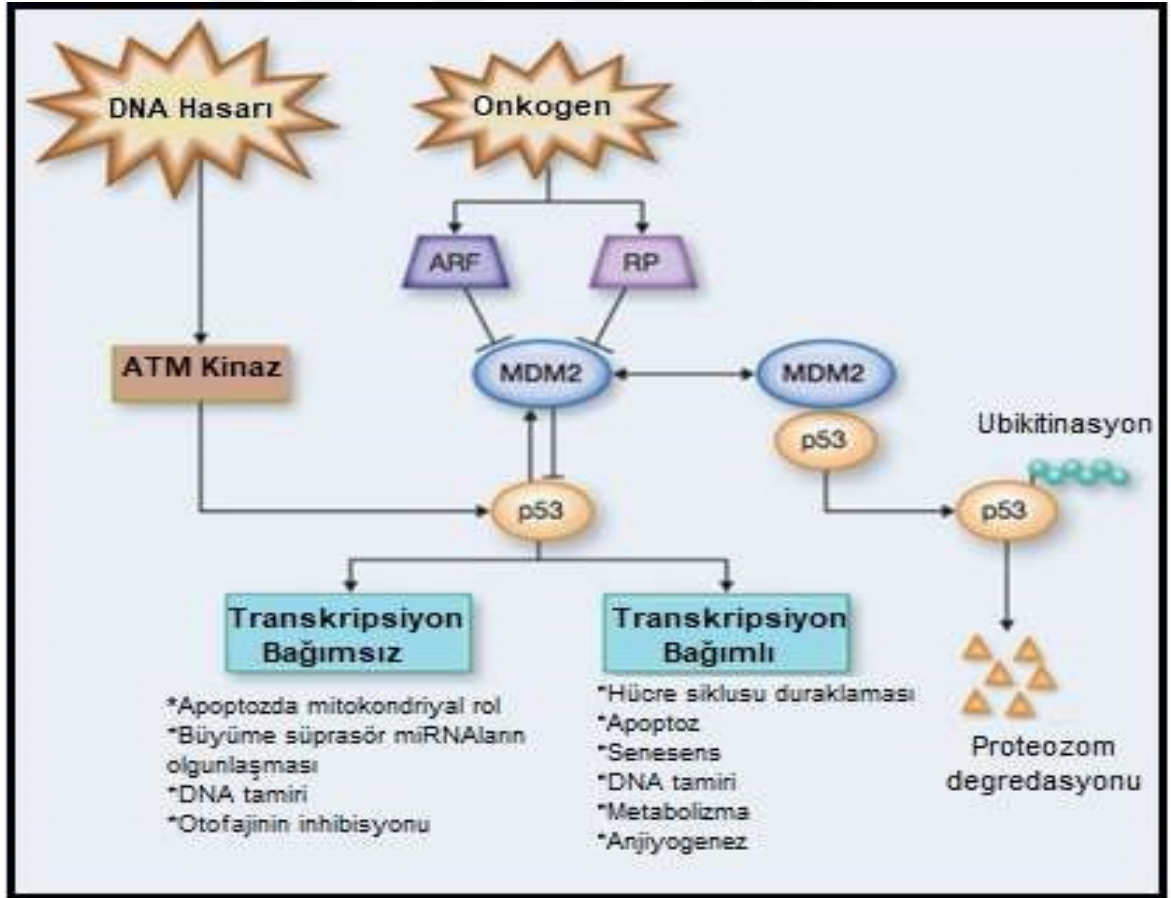
Pekçok hücre için sinyal ileti yolağı, hücre yüzey reseptörlerinden çekirdeğe ulaşan sinyaller aracılığıyla gen anlatımını değiştirebilir. Ancak JAK-STAT sinyal ileti yolağı en kısa yollardan birini oluşturur. STAT'lar bir gen düzenleyici protein çeşididir ve çeşitli sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilir. Aktivasyon JAK'ların tirozinleri fosforillemesi ile gerçekleşir. Aktive olan STAT'lar sitokin sinyalleşme genlerinin (SOCS) supresörlerinin transkripsiyonunu uyarır ve fosforile JAK'a ve reseptörlerine bağlanarak sitokinle uyarılmış hücrelerin aşırı aktivasyonunu inhibe eder. Bu nedenle SOCS, JAK/STAT yolağında negatif bir düzenleme döngüsünün parçasıdır. JAK'ların uyarılması hücrelerde hücre proliferasyonunu, migrasyonu, farklılaşmayı, apoptozu aktive eder ve inhibitörlerin deregülasyonu kanser başta olmak üzere bazı hastalıklara yol açar. HSK'da da JAK bağlayıcı proteinler SOCS ve SSI-1'in inaktivasyonu ve JAK/STAT yolağının aktivasyonu bildirilmiştir (Uren ve Turnley, 2014; Dhanasekaran ve diğ., 2015).



Şekil 2.5: JAK/STAT sitokin sinyalleşme yolağının SOCS ile inaktivasyonu (Uren ve Turnley, 2014).

2.1.4.6. Ubikitin Proteozom Yolağı

Ubikitin proteozom sistemi hücredeki proteinlerin yıkılmasında rol oynarlar. Proteinler ubikitin ile işaretlendikten sonra proteozomlar tarafından degrade olurlar. Ubikitin aktive edici enzim (E1) ATP-bağımlı ubikitin konjuge edici enzim (E2)'e aracılık eder veya doğrudan ubikitin bakiyesi substrat proteine aktarılır veya bir ubikitin ligaz olan E3 ile spesifik substratlar ubikitinlenir. PTEN, p53, p27, pRb, EGF reseptör tirozin kinaz, TGF β ve diğer hücre siklusu düzenleyicileri ve onkogenik moleküller gibi kanser ile ilişkili bazı proteinler ubikitin-proteozom sistemi ile regüle edilir. E3 ligazlar, p53'ü hedef alan MDM2 ve BRCA1 içeren; degradasyon için Smad proteinleri ve TGF β reseptör kompleksini hedef alan Smurf-2 (Smad ubikitinizasyon düzenleyici faktör-2); siklin E ve P38'i hedef alan FRA6E'yi içeren HSK'da tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gösterdiği raporlanmıştır (Meng ve diğ., 2014; Dhanasekaran ve diğ., 2015).



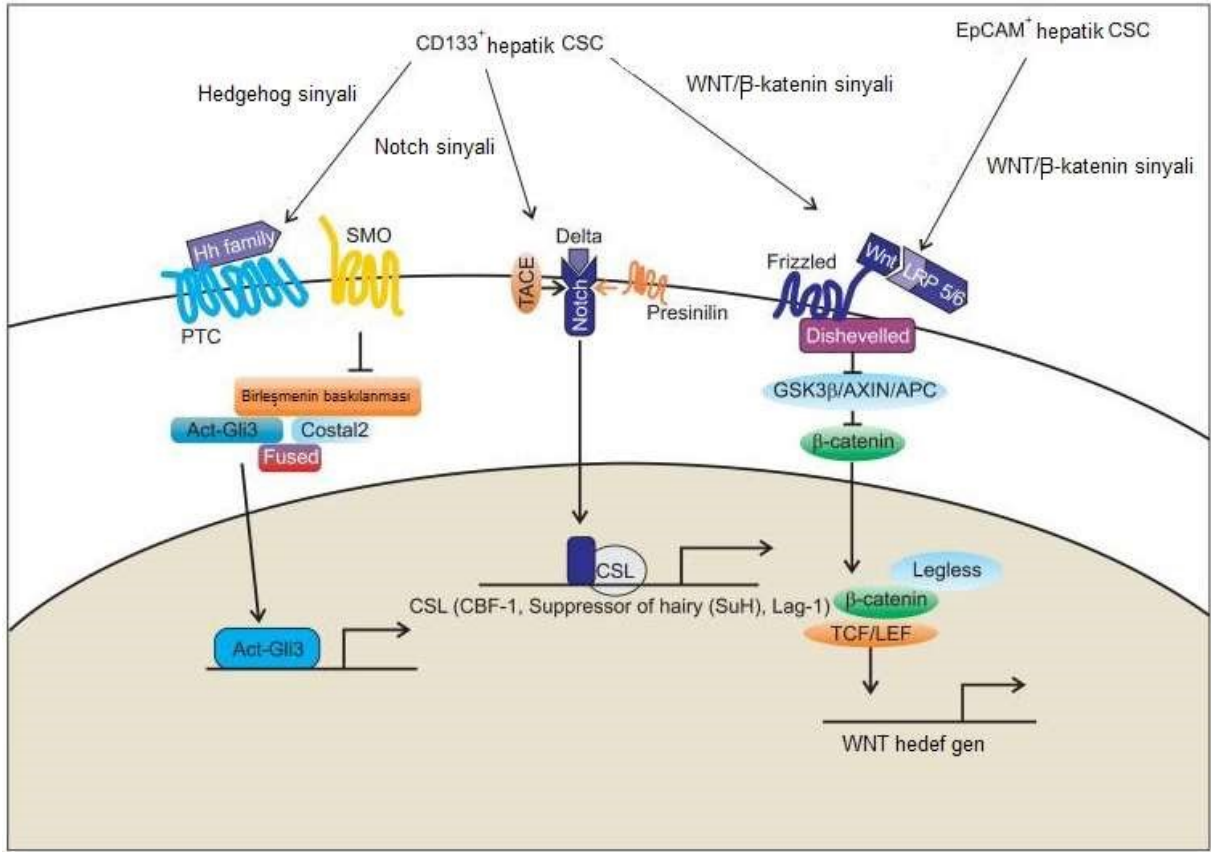
Şekil 2.6: MDM2 aktivasyonu ile p53'ün ubikitinasyonu (Meng ve diğ., 2014).

2.1.4.7. HSK'da İmmün Kaçış Mekanizmaları

Karaciğer, portal ven vasıtasıyla bağırsaktan sürekli olarak eksojen bir antijen akışına sahiptir ve bu nedenle de tolerojenik immün çevresi çok zengindir. Böyle bir çevrede gelişen HSK bazı mekanizmalar ile immün denetimden kaçabilir. CD4+ T hücrelerinin bir alt grubu olan T hücre düzenleyicileri efektör CD8 T hücrelerini baskılayarak anti-tümör immünitesinde negatif rol oynar. T düzenleyicilerinin infiltre (sızdığı) olduğu HSK dokularının görüldüğü ve böylece T düzenleyicilerinin HSK da patojenik rol oynadığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir. İmmün baskılanmanın diğer bir mekanizması ise interlekin-4 (IL-4), IL-5, IL-8 ve IL-10 gibi immünosüpresif sitokinlerde ki artış gösterirken immünite aktive edici sitokinlerin (IL-1, TNF ve interferon gamma) eş zamanlı olarak baskılanmasıdır. Sitokinlerdeki bu durumun tümör metastazını teşvik ettiği ve dolaşımdaki IL-10'un zayıf prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. İmmün kaçış mekanizmalarının bir diğeri ise programlanmış hücre ölümü (PD-L/PD-1) immün kontrol noktası yolağı ile tümör immünitesinin modülasyonudur. Kanseri hücrelerinde PD-L1'in artan ekspresyonu sayesinde efektör T hücrelerinin apoptozu indüklenir ve böylece bağışıklık kaçaklarına olanak sağlanmış olunur. İmmün kontrol noktası inhibitörleri efektif bir terapötik seçenek olarak değerlendirilmektedir, gerçekleştirilen faz I/II çalışmalarında anti-PD-1 monoklonal antikorunun herhangi bir toksisiteye yol açmadan ileri düzey HSK'da klinik olarak etkili oldukları gösterilmiştir (Dhanasekaran ve diğ., 2015).

2.1.4.8. HSK'da Kanseri Kökenli Hücreler

HSK'da kendi kendini yenileyen hücrelerin kökeni henüz net olmasada son zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalar ile tümör başlangıcının kök hücrelerin özelliklerine sahip bir alt hücre grubu tarafından gerçekleştiği fikrini kuvvetlendirmektedir. Bu kanser kök hücreleri (CSCs)'nin sadece tümör başlangıcı ile değil aynı zamanda çok daha agresif bir fenotipe sebep olan tümörün saldırganlığı, nüksetmesi ve metastazı ile de ilgili olduğu düşünülmektedir (Yoon, 2012; Dhanasekaran ve diğ., 2015).

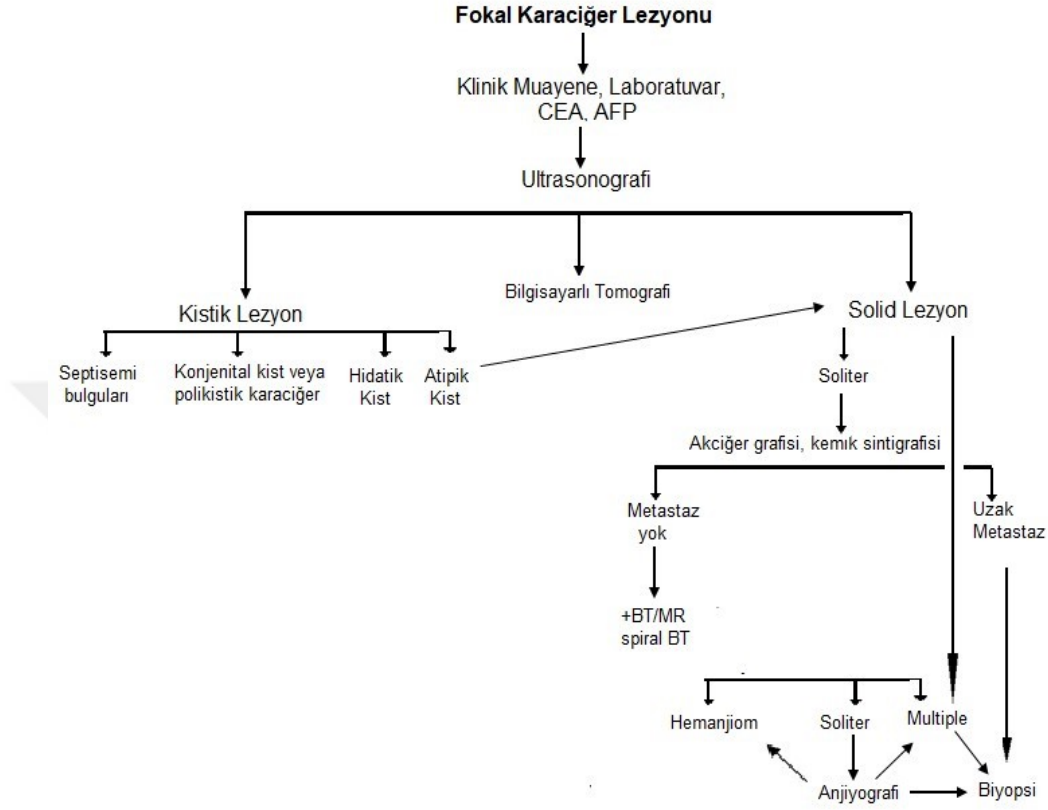


Şekil 2.8: Hepatik kanser kök hücreleri (CSCs) ile ilişkili sinyal yolları (Yoon, 2012).

2.1.5. Hepatoselüler Karsinomada Tanı ve Tedavi

HSK'da tanı ve tedavi yöntemleri Avrupa Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği (EASL) (Bruix ve diğ., 2001), Amerika Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği (AASLD) ve Asya-Pasifik Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği (APASL) (Ferenci ve diğ., 2010) tarafından yayınlanan yönergeler ışığında gerçekleşir. Serum alfa-fetoprotein (AFP) genellikle HSK'nın serolojik tanısı için kullanılır. HSK'ların yaklaşık % 50'sinde hepatositlerden AFP sekresyonu olur ve plazmadaki konsantrasyonunun 400 ng/mL'den daha fazla olduğu durumlarda HSK klinisyenler tarafından sorgulanır. Fakat özellikle erken tanıda kullanılmaları ve spesifitelerinin de azlığı sebebiyle daha ileri görüntüleme sistemlerine ihtiyaç duyulmuştur. Ön tanı için Ultrasonografi (USG), Bilgisayarlı tomografi (BT) ve Manyetik Rezonans (MR) gibi görüntüleme yöntemlerinden faydalanılır (Şekil 2.9). Görüntüleme yöntemlerinin önemi biyopsi veya ameliyat için öncesinde eğer varsa tümörün karaciğere yayılımı, anjiyogenezi ve safra tutulumu olup olmadığı gibi detaylı ve değerli bilgileri sunmasıdır. Böylece ameliyat öncesi lezyonun natürü ve cerrahi müdahale şeklinin sorgulanmasına olanak tanır. Fakat kesin

tanı biyopsi materyallerinin değerlendirilmesi ve derecelendirilmesi ile gerçekleşir (Tüzün ve diğ., 1999).



Şekil 2.9: Karaciğer lezyonlarında tanı diyagramı

Günümüzde ilerlemiş HSK için sorafenib kullanımı onaylanmış tek sistemik tedavidir. Buna ek olarak Reseptör Tirozin Kinaz Yolağında da bahsi geçen sülfataz inhibitörleri üzerine de çalışmalar devam etmektedir. Yeni moleküler mekanizmaların anlaşılıp yeni ilaç stratejilerini geliştirmek bu öldürücü malignite için çok önemlidir. Özellikle HSK'nın epidemiyolojik ve moleküler heterojinitesi HSK tanısı konulmuş hastalarda moleküler patogenezi anlamakta zorluk meydana getirir. Hastalıkla moleküler alt sınıfların daha fazla keşfedilmesi ve invaziv olmayan biyobelirteçleri doğrulamak ve tanımlamak acil ihtiyaçtır (Dhanasekaran ve diğ., 2015).

2.2. HEPATİT B VİRÜSÜ

Dünya sağlık örgütünün 2017 yılında yayımladığı Global Hepatit Raporu verilerine göre 257 milyon insan Hepatit B Virüs (HBV)'ü ile enfektidir ve yine aynı raporun verilerine göre 2015 yılında Dünya genelinde HBV enfeksiyonu nedeniyle 887.000 kişi hayatını yitirmiştir¹. HBV, Dünyadaki karaciğer hastalıklarının başlıca sebebidir. HBV enfeksiyonu HSK gelişmesinde en önemli risk faktörüdür.

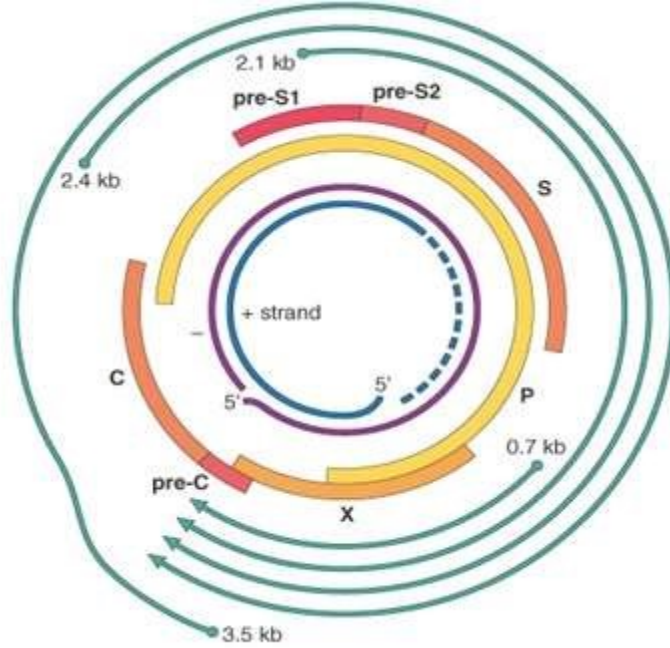
HBV, 1963 yılında Baruch Blumberg tarafından Avusturalya antijeni araştırılırken yanlışlıkla keşfedilmiştir. Hepadnaviridae'de olan zarflı, oldukça kompakt bir organizasyon temsil eden, dairesel ve kısmen çift iplikli bir DNA virüsüdür. Bilinen tek doğal konakçısı insanlardır. HBV ile enfeksiyon sonrasında kan dolaşımı ile karaciğere geçer ve sadece karaciğer dokularında replikasyonları olur. Enfeksiyöz virüsün çapı 42-47 nm çapındadır ve kanda mL başına 10^9 virion gibi yüksek konsantrasyonlarda dolaşırlar (Pai-dhungat ve Parikh, 2015).

2.2.1. Hepatit B Viral Genomu

HBV, 3200 nükleotid uzunluğunda, küresel bir şekile sahip olan ve bilinen en küçük DNA virüsüdür. Virion, enfeksiyöz virüs partikülü, Dünya genelinde nüfusun yaklaşık % 5'ini enfekte etmiştir. Virionun nükleokapsidi yaklaşık olarak 28 nm büyüklüğündedir ve hepatit B çekirdek antijenini oluşturup, viral genomun paketlenmesinde rol oynar. HBV partikülünün yüzeyinde 22 nm büyüklüğünde ve kompleks antijenik determinant olarak da görev yapan tübüler formda hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) yer almaktadır. Enfeksiyöz virionun membranı Golgi aygıtı ve endoplazmik retikulumdan tomurcuklanarak veya sekresyon transport mekanizmaları ile oluşur. Zarfın dış yüzeyindeki membranda boyutlarına göre isimlendirilen 3 viral yüzey proteini (HBsAg, HBmAg ve HBcAg) HBsAg'yi oluşturur. Bu 3 protein başlangıç kodonunu kodlayan ve polimeraz ile overlap yapan açık okuma çerçevesi (ORF)'den kodlanırlar. Virionun kor bölgesinin boş olması, Hepatit B virionunun replikatif olmadığını, dolu olması ise virionun replikatif olduğunu göstermektedir (Kidd-Ljunggren ve diğ., 2002; Ventkatakrishnan ve Zlotnick, 2016).

¹ <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> [Ziyaret Tarihi: 18.03.2019]

Hepadnaviral genomda S, C, X ve P olmak üzere 4 adet açık okuma penceresi (ORF) tanımlanmıştır (Şekil 2.10). ORF S, üç adet HBs proteinini, ORF C ise HBeAg ve HBcAg'yi kodlar. ORF X'in birden çok proteini kodladığı bilinmekle birlikte bu proteinlerin tamamı hakkında bilgi yoktur. ORF P ise Polimeraz enzimini kodlar. HBV DNA'sında intronlar (kodlanmayan bölgeler) bulunmaz ve bu nedenle post-transkripsiyonel kırpılmalar HBV RNA'sında görülmez. HBV genleri iç içe geçmiş durumda olduklarından aynı nükleotidler farklı proteinleri kodlar. Bu kompakt bir organizasyon sayesinde virüs genetik materyali oldukça ekonomik bir şekilde kullanılır. Böylece paketlenmiş genom tek iplikli, çift ve hatta üç iplikli bile olabilmektedir. HBV'nin diğer önemli özelliği ise RNA aracılığıyla kendini replike edebilmesidir. Kendi DNA'larını doğrudan konağın DNA'sına kopyalamaları nedeniyle diğer DNA virüslerinden farklılık gösterirler (Kidd-Ljunggren ve diğ., 2002).



Şekil 2.10: HBV genomunun şematik görünümü (Kidd-Ljunggren ve diğ., 2002).

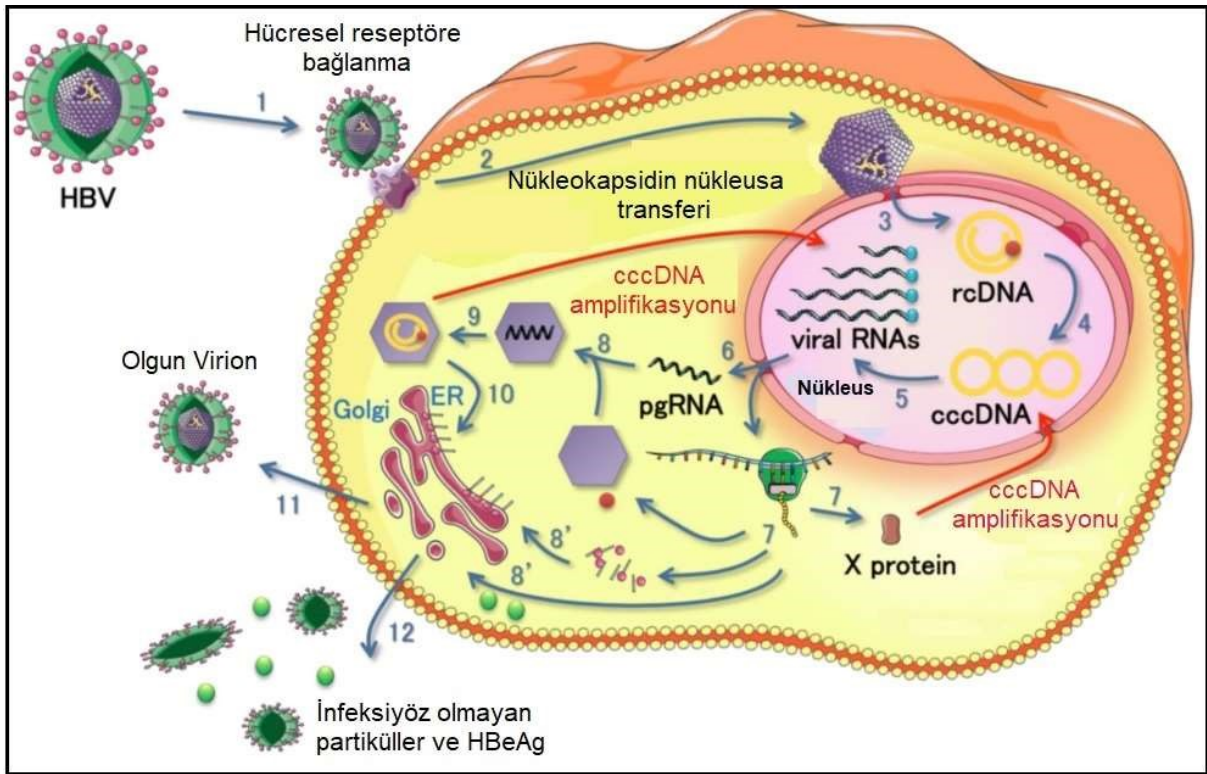
Pregenomik RNA, en büyük transkripttir ve viral replikasyon için şablon görevi görür. Pregenomik RNA'yı transkripte eden viral genom tarafından kodlanan tek enzim viral polimerazdır ve nükleokapsidin içerisinde yer alır. Nükleus geninin alternatif transkasyon ürünleri hepatit B zarf antijeni (HBeAg) ve hepatit B çekirdek antijeni (HBcAg) içerir. HBeAg'nin transkasyonu için akışın yukarısındaki dizilerde (upstream) ATG kodonu içeren bir ön çekirdek bölgesi (pre-core region) gereklidir. HBeAg transkasyon sonrası modifikasyona

uğrar ve viral replikasyonda önemli bir görev üstlenerek HBV enfeksiyonunun moleküler tanısında önemli bir rol oynar. HBeAg bir antijenik determinant olarak işlev görür ve serumda çözünür bir protein olarak dolaşır (Kidd-Ljunggren ve diğ., 2002; Ventkatakrisnhan ve Zlotnick, 2016).

2.2.2. HBV Yaşam Çevrimi, Patogenezi ve Bulaşma Yolları

Hepatositler, HBV için insan vücudunda konakçı hücrelerdir. Hücre hatları HBV virionları ile enfekte edilemez fakat HBV DNA'sı transenfeksiyon ile hücre hatları enfekte edilebilir. Ayrıca dağ sıçanı ve ördek HBV'leri gibi bazı Hepadnavirüsler hücre şartlarında çoğalabilirler (Thomas ve diğ., 2017).

HBV'nin konak hücreye tutunması olgun virion membranının üzerinde bulunan L proteini ile gerçekleşir. Virion plazma membranındaki reseptörlere tutunduktan sonra konakçı tarafından endositoz ile hücre içine alınır ve sonrasında nükleokapsid çekirdeğe girer. Virüsün genomu çekirdeğe girdiğinde dairesel bir DNA molekülüne dönüşür (cccDNA/covalently closed circular DNA). Sirküler bir yapı kazanan DNA'da transkripsiyon başlar ve üretilen proteinler (zarf, kor ve polimeraz) sitoplazmaya gönderilir. Viral proteinler sitoplazmada nükleokapsid içinde toplanıp, paketlenir. Sonrasında da enfeksiyöz olmayan partiküller veya enfeksiyöz virionlar olarak golgi cisimciği ve endoplazmik retikulum arasındaki bir parçadan tomurcuklanmış bir zarfla hepatosit dışına çıkarlar (Şekil 2.11). Hepatositler HBV enfeksiyonu sebebiyle ölmez, çok uzun zaman boyunca enfeksiyöz olmayan partikülleri ve aktif virionları yüksek miktarlarda hücre dışına salarak yaşayabilirler (Thirion ve Ochiya, 2013; Thomas ve diğ., 2017).



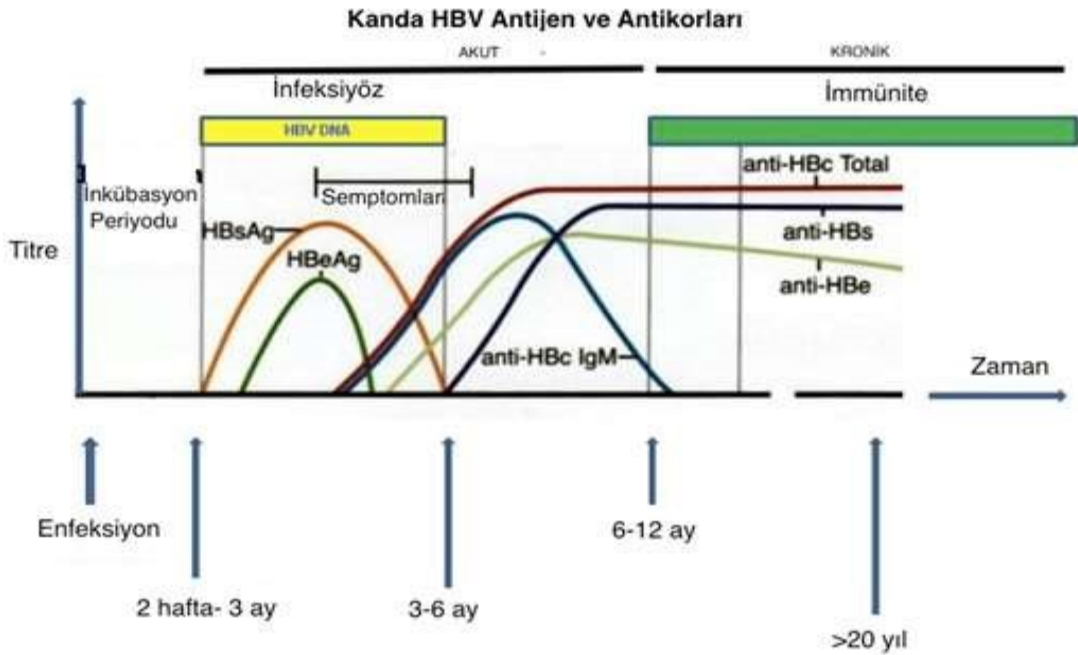
Şekil 2.11: HBV yaşam çevrimi (Thirion ve Ochiya, 2013).

HBV; perkütanöz (parenteral), horizontal, perinatal ve cinsel temas olmak üzere dört ana şekilde bulaşabilir. Perkütanöz bulaşma şeklinde kontamine kan ve kan ürünleri (cerrahi aletler, iğne, enjektör, damar içi uyuşturucu kullanımı, dövme, akupunktur, kulak delme, diş fırçası vb.) ile temas ile bulaşma gerçekleşir. Horizontal bulaşma şeklinde ise enfeksiyon kan, tükürük ve seröz sıvıların ciltteki lezyonlara teması ile olmaktadır. Özellikle Ortadoğu, Afrika ve Hindistan gibi yüksek endemizm gösteren bölgelerde çocuk ve genç erişkinlerde en önemli yayılma yoludur. Perinatal bulaşma ise, genellikle doğum sırasında taşıyıcı anneden bebeğe geçiş veya doğumdan sonra HBV ile enfekte anneye ait vücut sıvıları ile gerçekleşir. Yeni doğan döneminde virüsün alındıktan sonra immün sistem henüz gelişmediği için çoğunlukla kronik enfeksiyon ile sonuçlanır. Cinsel yolla bulaşma için ise homoseksüel cinsel ilişki HBV için en riskli bulaşma şeklidir (Thirion ve Ochiya, 2013; Thomas ve diğ., 2017).

2.2.3. Akut ve Kronik HBV Enfeksiyonu

HBV ile yeni enfekte olan kişilerde ortalama inkübasyon süresi 90 gündür. Hepatitlerin septomlarının gelişme olasılığı yaşa bağlıdır. Perinatal HBV enfeksiyonlarının % 90'ından

fazlası asemptomikken, akut hepatit tipik belirtileri 1-5 yaş arası çocukluk döneminde %5-15 arasında, daha büyük kişilerde ve erişkinlerde bu oran % 33-50 arasında olduğu gözlemlenmiştir. Akut hepatit B olan kişiler bulantı, karın ağrısı, kusma, ateş, sarılık, koyu idrar, dışkı renginde değişiklikler, hepatomegali ve splenomegali içeren belirtiler ve semptomlar gösterebilir. İlk serolojik belirteçler HBsAg ve hepatit B çekirdek antijendir. Enfeksiyondan 6-12 ay sonra hepatit B çekirdek antijenine karşı üretilen immunoglobulin M antikorları saptanamaz (Şekil 2.12). HBV enfeksiyonundan kurtulan kişilerde HBsAg kandan atılır ve iyileşme sırasında hepatit B yüzey antijenine karşı antikor gelişir. Hepatit B yüzey antijenlerinin varlığı enfeksiyona karşı bağışıklığı gösterir. İmmünosüprese kişilerde HBV enfeksiyonunun tekrarlanması görülebilir fakat bu tekrarlayan enfeksiyon siroz veya HSK için risk faktörü değildir (Orenbuch-Harroch ve diğ., 2008; Ayadpoor ve diğ., 2011).

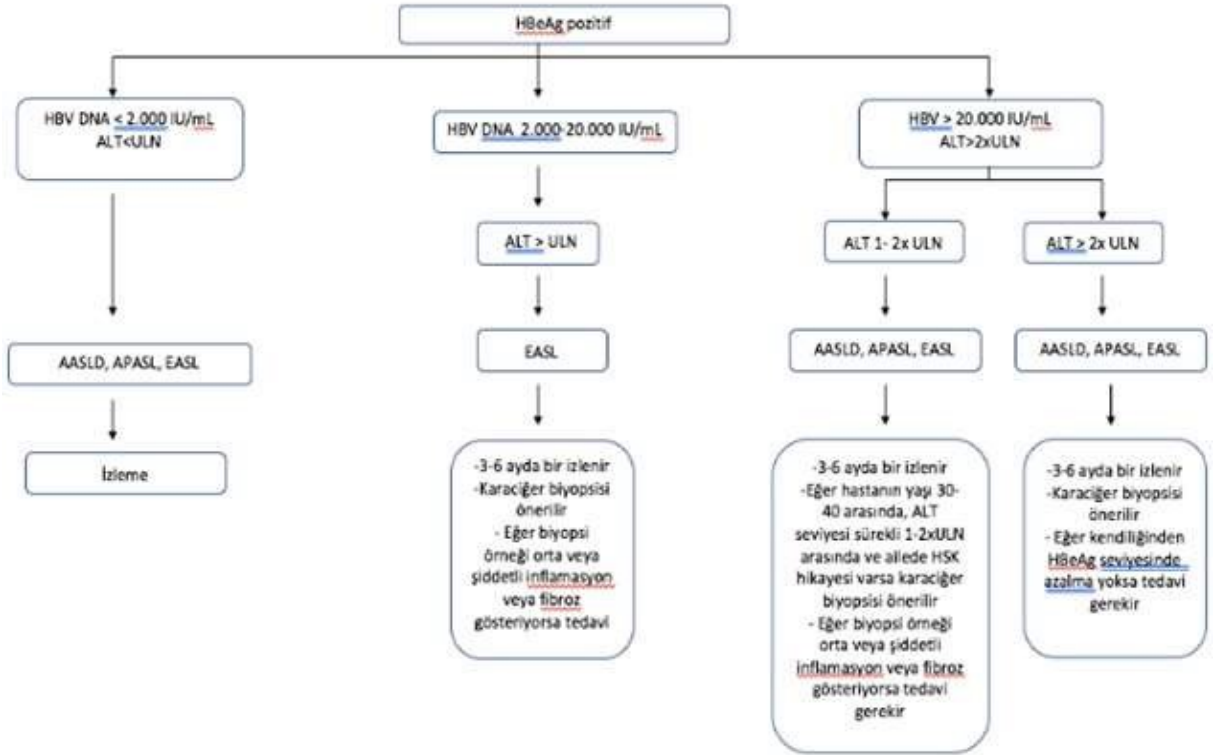


Şekil 2.12: Akut ve Kronik HBV enfeksiyonlarında kanda antijen ve antikor titreleri (Ayadpoor ve diğ., 2011).

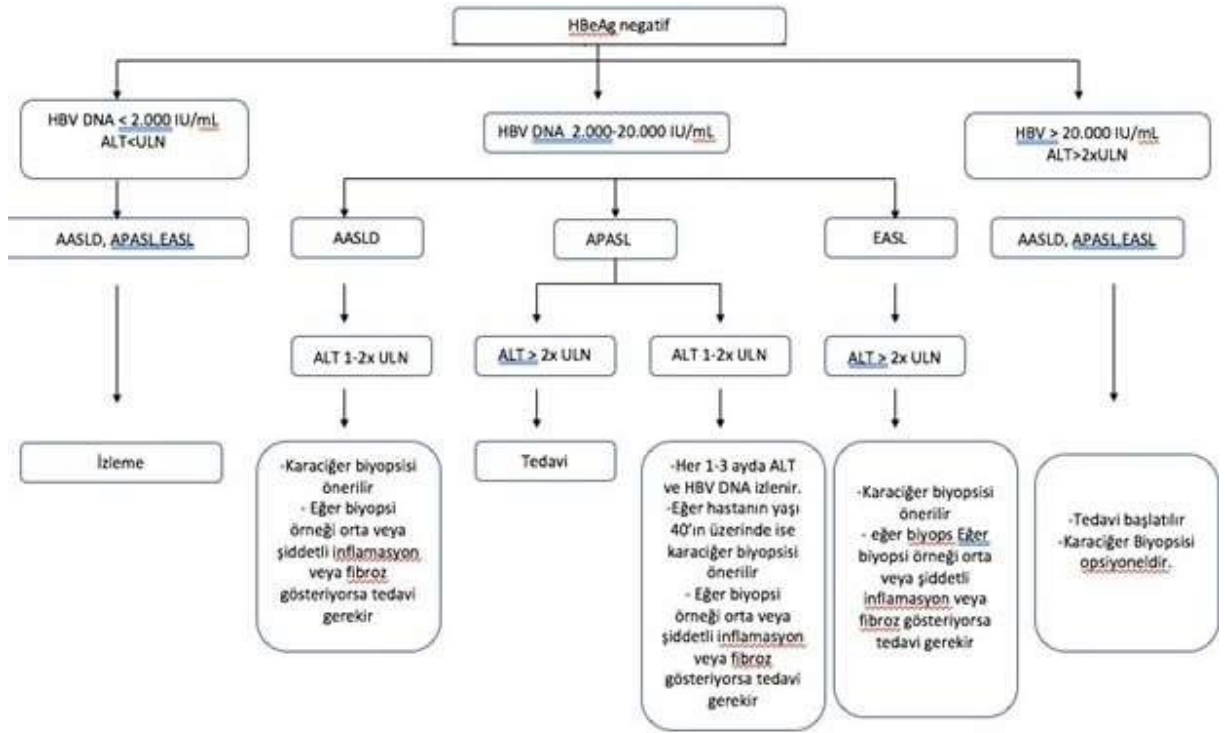
Kronik HBV enfeksiyonu en az 6 ay boyunca serumda veya immünoglobulin M antikorunu negatif olan kişilerde HBsAg varlığı ile tanımlanır. Akut HBV enfeksiyonlarında iyileşenlerin aksine HBsAg on yıllarca devam edip Anti-HBs'ye dönüşmez. Yüksek enfektivite ile korale olan yüksek viral replikasyon aktivitesinin bir belirtisi olarak HBeAg, genellikle erken safhada

ortaya çıkar. Kronik enfeksiyonu olan birçok kişi için HBeAg akut enfeksiyondan sonra saptanmaz hale gelir, bu da genellikle viral replikasyonda bir azalmayı gösterir. Erişkinlerde yaklaşık olarak % 0,5 ve çocuklarda daha da düşük oranlarda HBV enfeksiyonu HBsAg'yi temizleyip her yıl anti-HBs gelişimine sebep olur. Kronik enfeksiyona sahip kişilerin büyük çoğunluğu asemptomik kalmaya devam eder ve HBV ile ilişkili bir hastalık nedeniyle ölmez, fakat yapılan çalışmalar bebekler ve çocuklarda kronik enfeksiyonu takiben % 15-25 oranında siroz veya HSK geliştiğini göstermiştir. HSK ve siroz sekelleri geliştiren kişileri tanıya kadar asemptomik kalabilirler. Bu nedenle kronik olarak enfekte kişilerin tıbbi takipte olması ve düzenli taramalar ile serumda AFP seviyelerinin ölçümü ile ultrasonografi taramaları önerilir (Orenbuch-Harroch ve diğ., 2008; Ayadpoor ve diğ., 2011).

Avrupa Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği (EASL), Amerika Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği (AASLD) ve Asya-Pasifik Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği (APASL) tarafından yayımlanan kılavuzlara göre klinisyenlere yardımcı olup, tedaviyi yönetmek için sunulan yol haritasında özellikle HBeAg negatif olgularda, HBV DNA'nın 2.000 ile 20.000 arasında olduğu kantitatif değerlerde farklılıklar görülmektedir (Şekil 2.13 ve Şekil 2.14) (Yapali ve diğ., 2014).



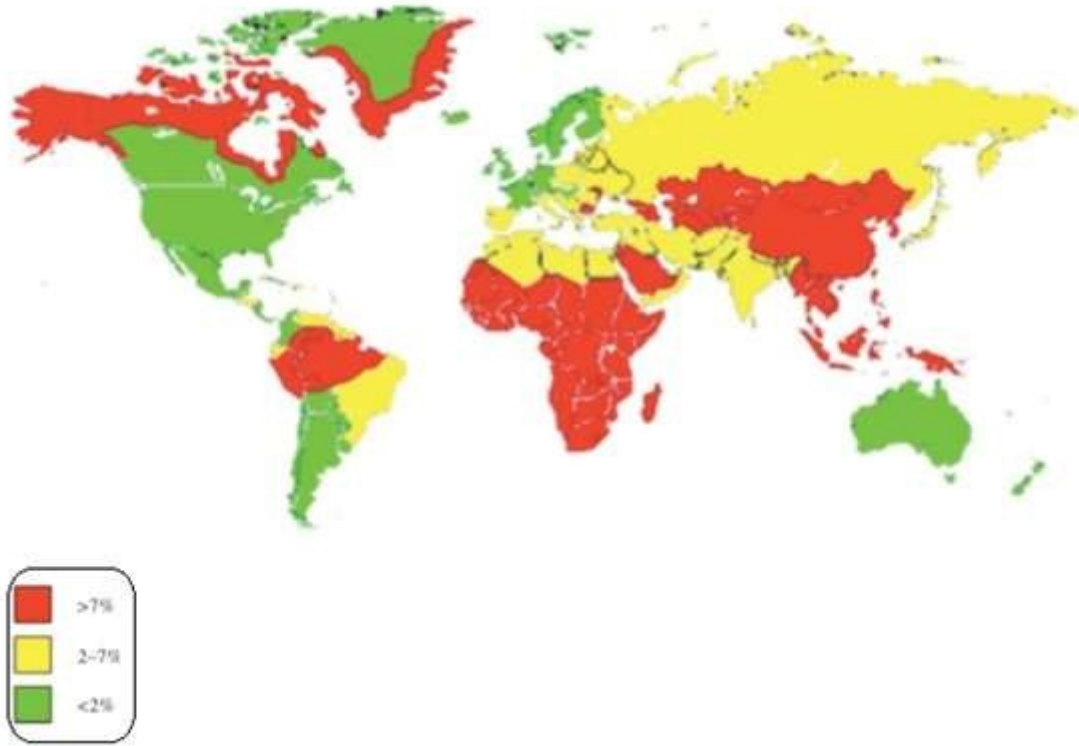
Şekil 2.13: HBeAg pozitif ise tedavinin yönetilmesinde EASL, AASLD ve APASL kılavuzları (Yapalı ve diğ., 2014).



Şekil 2.14: HBeAg negatif ise tedavinin yönetilmesinde EASL, AASLD ve APASL kılavuzları (Yapalı ve diğ., 2014).

2.2.4. HBV Epidemiyolojisi

HBV'nin Dünya'da dağılımına bakıldığında özellikle enfekte nüfusun büyük çoğunluğu Afrika ve Asya'dadır. Yine Kuzey Amerika ve Grönland'ın uzak kuzeyinde enfeksiyon oranı yüksek olsada bu bölgedeki düşük popülasyon nedeniyle enfekte kişi sayısı nispeten düşüktür (Şekil 2.15). Yılda yaklaşık 50 milyon yeni enfeksiyonu eklenen HBV için 2015 verilerine göre Dünya'da 257 milyon kronik enfeksiyona sahip olan insan olduğu rapor edilmiştir. Ülkemiz orta derecede endemik bir bölgededir (% 2-8) ve yaklaşık 3,5 milyona yakın taşıyıcı bulunduğu gösterilmiştir (Siddiqui ve diğ., 2017; Özkan, 2018).



Şekil 2.15: HBV'nin Dünya genelinde dağılımı (Siddiqui ve diğ., 2017).

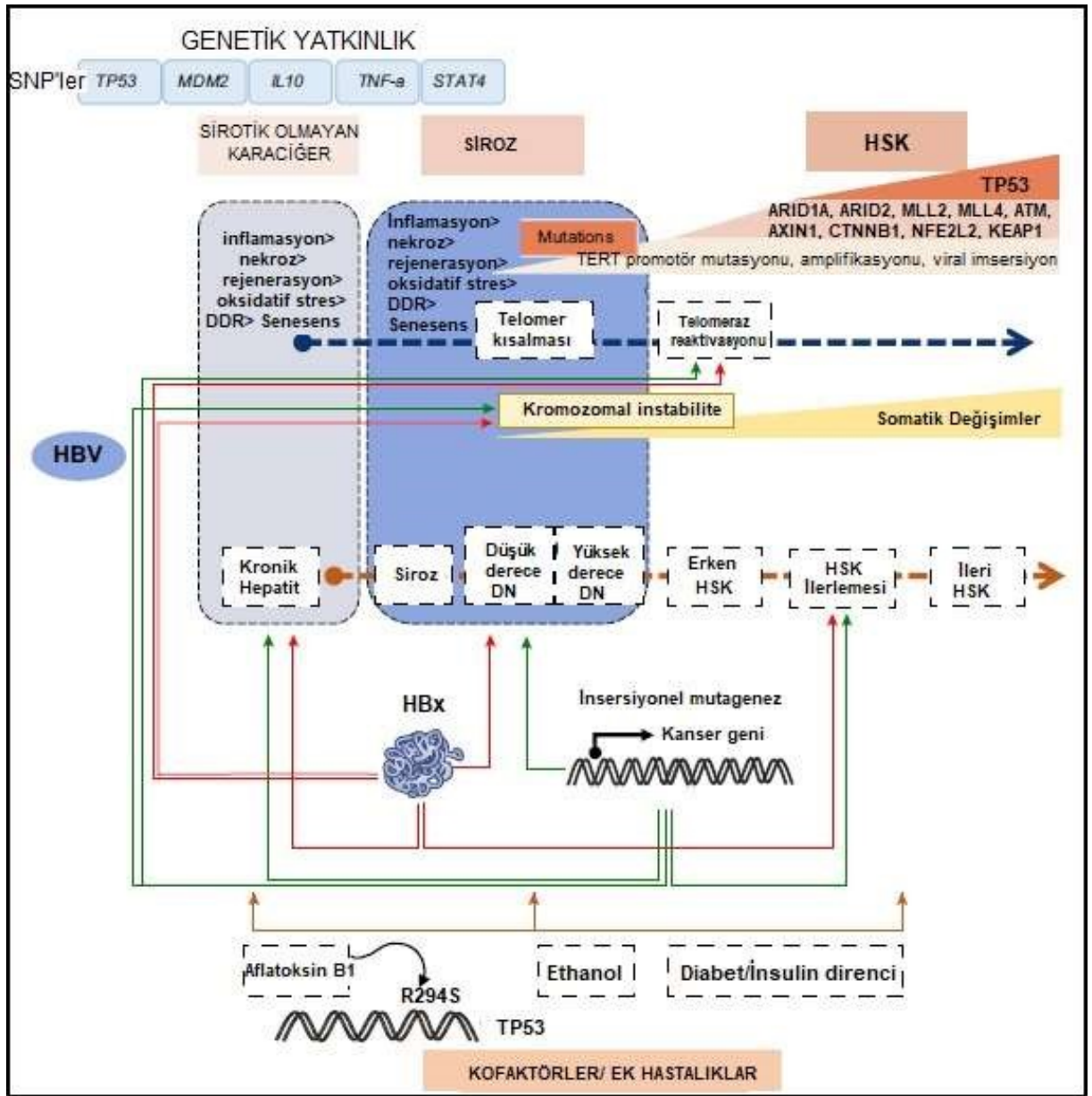
HBV'nin (A-H) 8 ana genotipi vardır. Bu genotipler farklı coğrafik bölgelerde farklı dağılımlar gösterirler. Ayrıca HBsAg'nin subtipi ve serotiplerine bakıldığında antijenik determinantına göre sınıflandırıldığı görülmektedir. Tüm HBV kökenlerinde 'a' determinantına ek olarak 'd' veya 'y' ile 'w' veya 'r' determinantları tanımlanmıştır. Bu üç determinantın farklı şekillerde bir araya gelmesiyle adw, adr, ayr ve ayw olmak üzere 4 ana serotip oluşmaktadır (Tablo 2.2). Bu serotiplerin enfeksiyonlardaki klinik önemi bilinmemektedir. Aynı zamanda genotiplerle serotipler arasında da bazı özgüllükler belirlenmiştir. Örneğin A, B, C ve F genotipi ile adw'ye özgü diziler; A, B, C, D ve E genotipi ile de ayw serotipine özgü diziler saptanmıştır (Jayalakshmi ve diğ., 2013).

Tablo 2.2: HBV Anagenotipleri ve Serotipleri (Jayalakshmi ve diğ., 2013).

Genotip	Serotip	Coğrafik Dağılım
A (A1-A6)	adw2	Afrika, Avrupa, Amerika, Avusturya
B (B1-B9)	adw2, ayw1	Güneydoğu Asya, Çin, Japonya
C (C1-C16)	adw2, ayr, adr _q -, adr _q +	Güneydoğu Asya, Çin, Japonya, Kore, Avusturya, Polonezya Adaları
D (D1-D7)	ayw2,3 ve 4	Akdeniz Çevresi, Orta Doğu, Doğu Avrupa, Hindistan
E (ND)	ayw4	Batı ve Orta Afrika
F (F1-F4)	adw4q-	Güney Amerika, Orta Amerika, Alaska ve Polonezya Adaları
G (ND)	adw2	Avrupa, Kuzey Amerika
H (ND)	adw4	Orta Amerika, Meksika
I (ND)	adw	Vietnam, Laos, Hindistan
J (ND)		Japonya

2.2.5. Viral Hepatit Kaynaklı HSK'nın Moleküler Mekanizması

HBV'nin karaciğer hasarından sorumlu olduğu bilinmesine rağmen bunu hangi mekanizmalarla gerçekleştirdiği net olarak ortaya konulamamıştır. Virüsün sitopatik olmadığı, enfekte hepatositlere karşı gelişen immün yanıtın karaciğer hasarından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte konakçı immün yanıtına ek olarak, virüsün antijenik yapısındaki antijen ekspresyonu ve replikasyon kapasitesindeki değişiklikler farklı görünümde karaciğer hasarına neden olmaktadır. Yine HBV'nin karaciğerde hücre bölünmesini artırıcı etkisinin yanı sıra ayrıca hücre çoğalmasının kontrolünün doğrudan değişmesini de desteklemektedir (Levrero ve Zucman- Rossi, 2016).



Şekil 2.16: HBV ilişkili Hepatoselüler karsinoma gelişmesi ve ilerlemesinde virüs, konakçı genetik yatkınlığı ve çevresel faktörlerin ilişkisi (Levrero ve Zucman- Rossi, 2016).

HSK birçok sinyal yolağını içermesi, kompleks mutasyonel doğası nedeniyle moleküler ve genetik seviyede oldukça heterojen bir tümördür. Özellikle genetik yatkınlık incelendiğinde bazı tek nükleotid polimorfizimlerinin (SNP) HSK ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bunların en sık rastlananları arasında inflamasyon yolağında anahtar bir protein olan STAT4, PTEN homologu olan TPTE2, HSK patogenezinde tümör supresör gen olan DCL1, UBE4, KIF1B ve PGD genlerindeki mutasyonlardır (Şekil 2.16). Bunlara ek olarak CTL-4, TGF-β1,

XRCC3, MDM2, MTHFR ve TS genlerinde meydana gelen mutasyonlar da tanımlanmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda 6 ana yolda (Wnt/ β -katenin yolağı, p53 ve hücre siklusu yolağı, oksidatif stres, epigenetik değişimler ve RAS/RAF/mitojen-aktif edilmiş protein kinaz yolağı) tekrarlanan mutasyonlar olduğu tanımlanmıştır (Tablo 2.3). Bahsi geçen yollardaki mutasyonlar Tablo 2.3’de özetlenmiştir. Telomeraz reaktivasyonu somatik TERT promotör mutasyonları (% 54-60), TERT amplifikasyonları (% 5-6) ve HBV’nin TERT promotörüne insersiyonu (% 10-15) nedeniyle HSK vakalarının % 90’ından fazlasında görülür. Yine önemli mutasyonlardan bir diğeri olan P53 inaktivasyonu ve hücre siklusu yolağı aktivasyonu HBV’ye bağlı HSK’da sıklıkla görülür ve bunlar genellikle tümörün agresifliği ve kötü prognozla ilişkilidir. NRF2’yi aktive eden veya KEAP1’i inaktive eden mutasyonlar, NRF2’nin ubiquitinasyonunu engeller ve fiziksel degradasyondan korur, NRF2’yi aktive eden veya KEAP1’i inaktive eden mutasyonlar, NRF2’nin ubiquitinasyonunu engeller ve fiziksel degradasyondan korur (Migita ve diğ., 2005; Levrero ve Zucman- Rossi, 2016).

Tablo 2.3: Yolların mutasyon frekansları

Yol	Mutasyonlar (Frekansları)
Wnt/ β -katenin yolağı	CTNNB1 (%11-37) , AXIN1 (%5-15), APC (%1-2)
p53 yolağı	TP53 (%12-48)
Hücre siklusu yolağı	CDKN2A delesyonu (%2-12), RB1 mutasyonları (%3-8), CCND1/FGF19 lokuslarının amplifikasyonları (%5-14), CCNE1’de tekrarlayan HBV insersiyonu
Oksidatif stres yolağı	NRF2’yi aktive eden veya KEAP1’i inaktive eden mutasyonlar (%5-15)
Epigenetik değişim yolları	ARID1A (%4-17), H3K4 histon metil transferaz mutasyonları MLL (%3-4), MLL2 (%2-3), MLL3 (%3-6), MLL4 (%10)
RAS/RAF/Mitojen-aktif edilmiş protein kinaz yolağı	RAS mutasyonları (<%2), RP6SKA3 mutasyonlar (%2-9), PTEN’nin delesyonu (%1-3) protein kinaz aktivasyonu (%5-10), TSC1 ve TSC2 mutasyonları (%3-8)

Kodlanmayan mikroRNA'lar ve lncRNA'lar karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve hepatokarsinogenezde anahtar oyuncular olarak giderek daha fazla önemli hale gelmiştir. HSK hücre hatları veya karaciğer dokularında yapılan çalışmalarla bazı mikroRNAların ekspresyonlarının arttığı (miR-18, miR-21, miR-155, miR-221, miR-222, miR-224, miR-301, miR-331, miR-373, miR-485, miR-495, miR-664) bazılarının ise ekspresyonlarının azaldığı (miR-26a, miR-29, miR122, miR125, miR-130a, miR-150, miR-193b, miR-199a, miR-200, miR-223) rapor edilmiştir. HSK'nın HBV ile ilişkili olmasına bağlı olarak miRNA'ların bazılarında (miR-143, miR-34, miR-19) ekspresyonunun çok daha fazla arttığı ve çok daha agresif bir biyolojik fenotip ortaya çıktığı da edinilmiş önemli bir bilgidir (Ghidini ve Braconi, 2015; Levrero ve Zucman- Rossi, 2016).

Tablo 2.4: Virüslerin neden olduğu hepatoselular karsinomada mutasyonel değişimler ve etkileri.

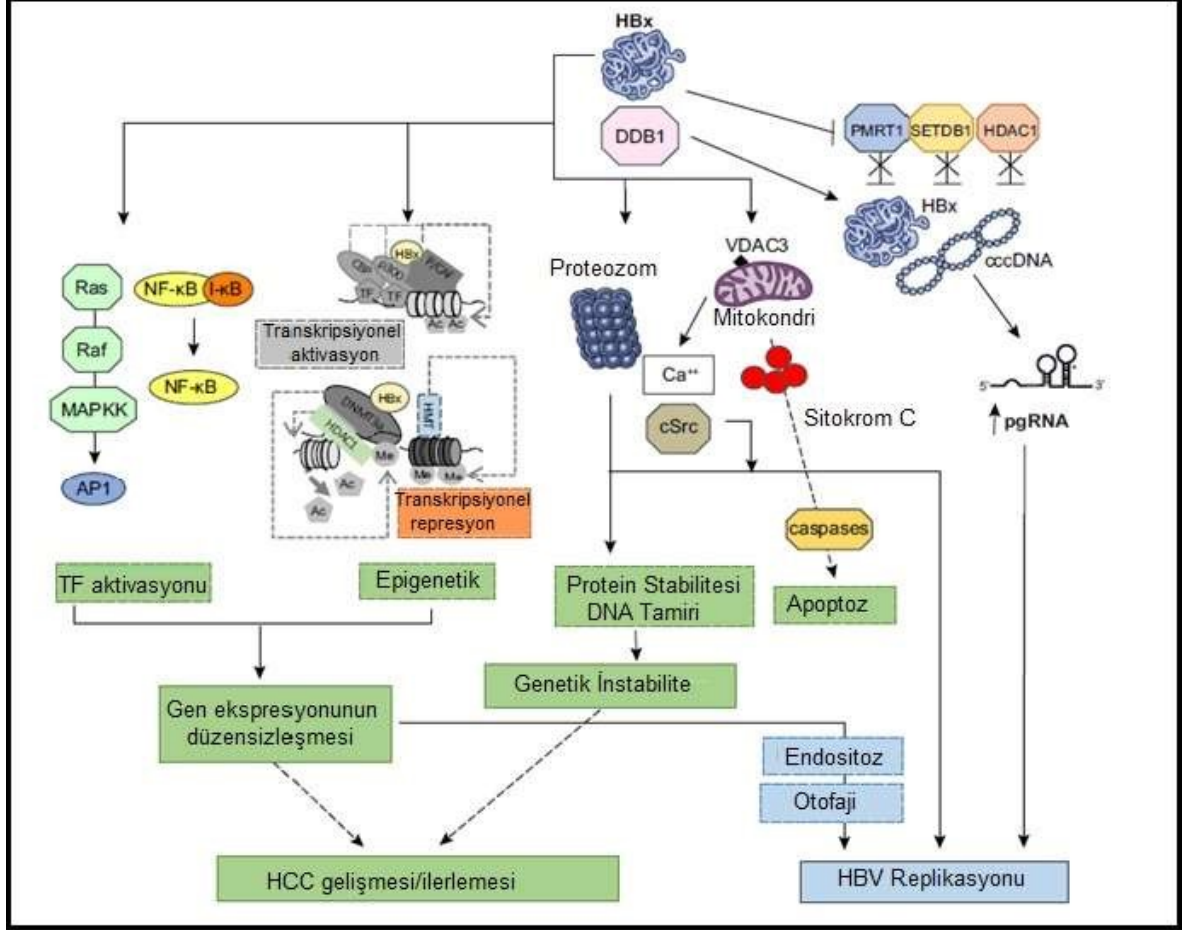
Viral Tümörlerde Mutasyonel Artış ve Değişimler	Durum/Sonuç
p16INK4A, E-kadherin, ASPP1 genlerinin promotörlerinde metilasyon oranı	Artış/Tümör baskılayıcı genlerin promotörlerinde hipermetilasyon
HDAC1,2 ve 3 ekspresyon oranı	Artış/Karaciğer nakli sonrası nüks artışı
EZH2,G9a histon metil transferaz ekspresyonu	Artış/ Terapötik değeri olan bu genlerin ekspresyonlarının azalması
ARID1A, ARIDS1B, ARID2, MLL ve MLL3 mutasyonları	Artış/Nükleozom yeniden modelleme elemanları
Siklin A mutasyonları	Artış/hepatosit proliferasyonu
HBx-LINE1 ekspresyonu	Artış/ HBV replikasyonuna etki eden miR-122'ye bağlanır
Kopya sayısı değişimleri	Artış/Kromozomal kararsızlık

Yine HBV ile ilişkili HSK'da epigenetik değişiklikler incelendiğinde, kromatin yeniden modellenmesi ve DNA metilasyonu ile gen ekspresyonunun epigenetik kontrolü, enzimatik kovalent histon modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon) ve ATP bağımlı kromatin yeniden modelleyen kompleks ile nükleozomal yeniden yapılanmadan bahsedilebilir (Tablo 2.4) (Levrero ve Zucman- Rossi, 2016).

Bunlara ek olarak HBV karsinogenezi 3 farklı mekanizma ile teşvik edebilir. Bunlar; viral DNA'nın konakçının TERT, CCNE1 ve MLL4 gibi kanser genlerine integrasyonu ile klasik retrovirüs benzeri mutageniz; viral DNA'nın konakçı genomuna girmesi ve viral proteinlerin aktivitesi ile genomik instabilitenin artması; hücre fonksiyonlarını etkileyen, onkogenik yolların aktive olmasına ve karaciğer hücrelerinin mutasyonlara duyarlı olmasına neden olan doğal veya mutasyona uğramış viral proteinlerin (HBx, HBc ve preS) varlığıdır. HBV DNA'nın konakçı kromozomlarına integrasyonu viral replikasyon için zorunlu olmamasına rağmen, HSK vakalarının % 80'inde ve HBV enfeksiyonunun erken evrelerinde görülür. HBV'nin integrasyonunun klonal hücre popülasyonuna büyüme avantajı sağladığı ve ek mutasyonların birikmesine neden olduğu düşünülmektedir (Levrero ve Zucman- Rossi, 2016).

HBx, HBV ile ilişkili HSK'da çok kilit rollere sahiptir. Mitotik kontrol noktalarını doğrudan etkileyerek, p53'e bağlanıp inaktive ederek ve DNA tamir proteinine bağlanarak (DDB1) kromozomal kararsızlığı indükler. Ayrıca viral proteinlerden HBx, HBc ve preS'in hücre fonksiyonlarını (hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve karaciğer hücrelerinin mutajenlere duyarlılığını) etkilerler. HBx proteini HBV'nin cccDNA transkripsiyonu, viral replikasyonu için ve ayrıca HBV'nin onkogenisitesine katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.17). Kromatin fonksiyonu üzerinde doğrudan etkisi ve nükleusta transkripsiyonu ve/veya dolaylı olarak sitoplazmada hücre sinyalleşmesinin düzenlemesi vasıtasıyla transkripsiyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. HBx cccDNA içerisine entegre olarak nüklear cccDNA mini kromozomunun transkripsiyonunun artırılmasında rol oynar. HBx yokluğunda cccDNA'ya bağlanan histonlar hipoasetiledir ve cccDNA belirgin şekilde daha az pgRNA transkribe eder. HBx ayrıca HBV transkripsiyonunun inhibe eden PRMT1 metiltransferaz, Tudor-domeni protein spindlin-1 ve SETDB1 histon metiltransferaza bağlanarak bloklar. HBx'in HBV replikasyonunu kuvvetlendiren diğer mekanizmalarının başında miR-101 vasıtasıyla DNMT3A'nın ekspresyonunun downregülasyonu, viral replikasyon için gerekli endositoz (Rab ailesi) ve otofaj (ATGs, beclin-1, miR-33a) yapan gen ve miRNA'ların doğrudan transkripsiyonlarının aktivasyonu, UV-DDB1 proteinine bağlanarak Smc5/Smc6 bağımlı cccDNA transkripsiyonunun engellenmesi, sitoplazmik kalsiyum seviyesinin yükseltilmesi, doğrudan HBV pgRNA'yı hedefleyen miRNA'ların (miR-138, miR-224, miR-596) transkripsiyonel baskılanmaları yer almaktadır. HBx'in transkripsiyonun aktivasyonu birçok epigenetik değişime, çoklu transkripsiyonel faktörlerine (ATF/CREB, ATF3, c/EBP, NF-IL-6, ETS, EGR, SMAD4, OCT1, RXR reseptörü ve p53), kromatin modifiye edici

enzimlere (CBP, p300 ve PCAF) ve bazal transkripsiyonel mekanizmalara (RPB5, TFIIB, TBP, TFIIF) bağlıdır (Levrero ve Zucman- Rossi, 2016).



Şekil 2.17: HBx proteininin hepatoselular karsinoma gelişmesinde moleküler mekanizması (Levrero ve Zucman- Rossi, 2016).

Kronik HBV ve HCV enfeksiyonlarında inflamasyon, oksidatif ve onkogenik stres hücrel yaşlanmayı hızlandırır. Telomerazlar normal karaciğerden siroza doğru ilerlerken aşamalı olarak kısırlar ve HSK’da en kısa seviyelere ulaşırlar. Yaşlılık hasarlı hücrelerin çoğalmasını sınırlar ve tümör baskılayıcıların ekspresyonunu tetikleyerek malignite riskini azaltır. Yapılan çalışmalar HSK’ların % 80-90’ında telomeraz aktivitesinin gerçekleşerek yaşlanmanın baypas edildiği görülmüştür. HSK’da en sık görülen genetik değişim TERT promotör mutasyonlarının telomeraz ekspresyonunu aktive etmesidir. Fakat HBV DNA’sının TERT geni içerisine entegrasyonu ve HBx ve PreS2 proteinleri tarafından TERT ekspresyonunun artırılması gibi diğer mekanizmalar bu aktivasyonu daha az temsil eder. HBx proteini yaşlanmanın üstesinden

gelmek için p53 nükleotit kesme onarım ve transkripsiyon bağılı onarım fonksiyonlarını inhibe eder ve p53 aktivatörleri ASPP1 ve ASPP2'nin ekspresyonunu azaltır (Levrero ve Zucman-Rossi, 2016).

HBx proteinin bir diğer işlevi ise bulunduğu hücre içeriğine ve seviyesine göre pro-apoptotik ve anti-apoptotik özellik gösterebilmesidir. HBV'nin replike olduğu hücrelerde HBx proteini sitozolik kalsiyum sinyalleşmesini teşvik eder ve bunun sonucu olarak mitokondride Ca^{+2} birikimi ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına, endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabının aktivasyonuna yol açar. HBx ayrıca mitokondrial voltaj bağımlı anyon seçici kanal protein 3 (VDAC3)'e bağlanarak membranın deporilizasyonuna ve böylece ROS üretimine ve sonrasında da apoptoza neden olur. Ayrıca yüksek HBx seviyesinin NF- κ B'nin aktifleşmesiyle tümör nekroz faktör α (TNF α)'yı ve FAS-aracılı apoptozu bloke eder, böylece enfekte olmamış hepatositler dahi apoptoza giderken enfekte olmuş hepatositler immün aracılı hasardan kaçınabilirler. Siroz nodülleri oksijen gerilimi ve hipoksida lokal azalmalar oluşturabilen ve böylece HIF1a ekspresyonunu düzenleyen ve anjiyogenezi teşvik eden damar düzeninde göreceli bir bozukluğa sahiptir. HBx, HIF1a'ya bağlanır ve stabilize ederek HIF1a transkripsiyonunu uyarır, böylece anjiyogenezi ve tümör büyümesini artırır. HBx ayrıca pro-anjiyojenik büyüme faktörü anjiyopoietin 2'yi (ANG2) düzenleyerek anjiyogenezi teşvik eder. HBx ayrıca SMAD bağımlı (SMAD4 kompleksinin stabilizasyonu yoluyla) ve SMAD'a bağımlı olmayan yollardan (RAS – ERK ve PI3K – AKT'nin aktivasyonu ile) doğrudan TGF β 1 ve TGF β 1 sinyalleşmesini de düzenler. HBx bunun yanında DNA metilasyonunu destekleyerek ve SNAIL regülasyonunu sağlayarak E-kadherini baskılar. HBx faaliyetleri hakkında fazla sayıda çalışmalar gerçekleştirilse de HBV enfeksiyon sistemleri ile ilgili çok fazla bulgunun olmadığını da belirtmek gerekir (Levrero ve Zucman-Rossi, 2016).

2.2.6. HBV ile İmmün Sistem İlişkisi

HBV ile enfekte olmuş kişilerde hastalığın nasıl seyredeceğini belirleyen ana faktörlerden biri hastalık ile karşılaşılacak yaşıdır. Yeni doğanlarda % 90'a varan kronikleşme, 1 ile 5 yaş arası çocuklarda % 20-30 arasında, yetişkinlerde ise % 5 civarındadır. Kronik enfeksiyon sonrasında sırasıyla kronik hepatite, siroza ve sonunda HSK'ya kadar ilerleyen bir yol izler. Ayrıca erişkinlerde inaktif olan taşıyıcılık klinik enfeksiyona neden olmadan doğrudan HSK'ya da sebep olabilir (Fattovich ve diğ., 2004).

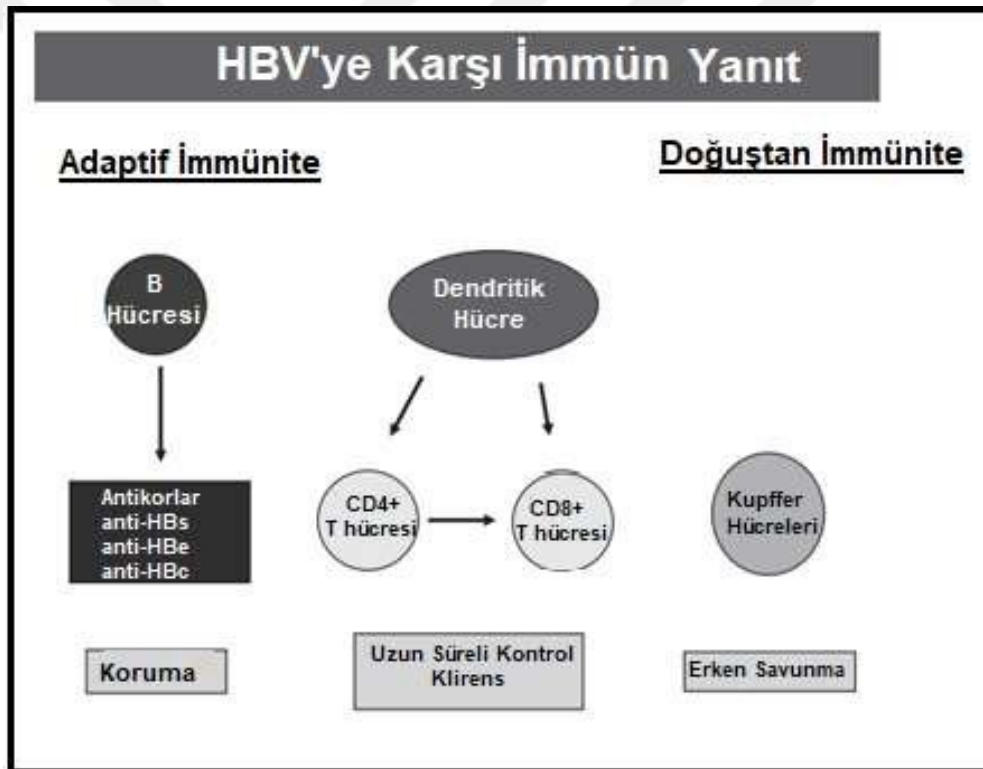
Virüsün temizlenmesi (klirens) ve hastalığın patogeneğinde büyük ölçüde adaptif immün yanıt rol oynamaktadır. İlginç bir şekilde HBV doğuştan gelen bağışıklık yanıtını uyarmayarak gizli bir virüs gibi kendini korur. Diğer yandan viral direnç HBV spesifik T hücrelerinin düşük uyum özelliği ile karakterizedir. Bazı viral proteinlerin HBV'ye adaptif immün cevabı düzenlediği gösterilmiştir ve bu da HBV'nin adaptif immün cevabı hedef alan bazı aktif kaçınma stratejilerini kullanabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar kronik HBV enfeksiyonunda antiviral tedavinin CD8+ T hücresi cevap yeteneği düşüklüğünü aşabileceğini göstermiştir (Wurstorn ve diğ., 2010; Schmidt ve diğ.2013).

Virüs replikasyonu çoğunlukla IFN α/β yolağının uyarılmasıyla doğal immün yanıtın indüklenmesine sebep olur. IFN α/β üretimi çok sayıda interferon ile indüklenebilir genin transkripsiyonel ekspresyonunu başlatır ve bu da viral üretim ve yayılımı sınırlandırarak patojenik süreçleri en aza indirmeye potansiyeline sahip çeşitli hücre içi antiviral mekanizmaları uyarır. Adaptif immün yanıt incelendiğinde, antikorların HBV zarf antijenlerine karşı gösterdikleri cevap T hücrelerine bağımlı olduğunu gösterilmiştir. HBV'ye karşı periferik kan CD4 hücresi yanıtı akut hastalarda kuvvetli ve multispesifikken, kronik hastalarda zayıftır (Wurstorn ve diğ., 2010; Schmidt ve diğ.2013).

Sağlıklı immüniteye sahip kişilerde HBV'nin tamamen ortadan kaldırılması ve replikasyon kontrolü doğal (innate) immünite ile sağlanmaz, kazanılmış immün yanıt devreye girer. Enfeksiyon sonrası hepatositlerden salınan interferon alfa ve beta majör doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf 1 ve 2'yi uyarır. MHC sınıf 1, HBV'nin hücre içi antijenlerini hepatositlerin yüzeyinde bulunan CD 8+ sitotoksik T hücrelerine (CTL) sunarlar ve CTL'ler uyarılmış olur. Aynı şekilde MHC sınıf 2 ise HBV'nin plazmadaki HBcAg ve HBeAg gibi antijenlerini makrofajlar üzerindeki CD4+ T hücrelerine (T yardımcı hücreleri) sunarak bu hücreleri uyarırlar. CD8+ sitotoksik T hücreleri (CTL) patojen ile enfekte konak hücreler ile kendileri arasında sinaptik bir yapı benzeri bağlantı kurarak doğrudan hücreye temasla granül içeriğini (lizozom, perforin, granzim vb) hücre içine boşaltarak enfekte hücreyi öldürür. Ayrıca CTL hücreleri viral replikasyonu baskılayacak sitokinleri (IFN- α , TNF- α ve IL-2) üreterek MHC sınıf 2 ekspresyonunu artırır (Homma ve diğ, 2005; Schmidt ve diğ.2013).

Kupffer hücresi indüklü nükleer faktör kappa B (NF-kB) ve interlökin 6 (IL-6) aracılı inflamatuvar cevap, enfekte olan karaciğer hücrelerinin öldürülmesine izin vermeden virüsün transkripsiyon seviyesini kontrol eder. Virüsün ortadan kaldırılması güçlü bir CD4 ve CD8 T

hücresi yanıtı gerektirir (Şekil 2.18). HBV enfeksiyonu olan hastalarda, HBcAg, HBsAg ve polimerazın farklı epitoplarına karşı CD8+ T hücrelerinin güçlü sistotoksik aktivitesini indükleyebilmektedir, fakat bunun aksine kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda T hücresi yanıtı çok zayıftır veya yoktur. HBV nükleokapsidine (HBcAg) karşı CD4 T hücresi yanıtı, kronik HBV ile enfekte olmuş hastalarda serokonversiyon sırasında HBeAg'den anti-HBeAg'ye kadar kuvvetlidir. Kronik enfeksiyonu olan hastalarda, devam eden HBV replikasyonu ve viral antijenin üretimi, virüs spesifik adaptif immünitenin tükenmesinin bir nedeni olabileceği düşünülmektedir. Zayıf T hücresi yanıtının diğer olası nedeni ise, dendritik hücre bozukluğu, düzenleyici T hücrelerinin veya karaciğerin immünolojik özellikleri ile ilgili olabilir (Wurstorn ve diğ., 2010).



Şekil 2.18: HBV’de immün yanıt (Wurstorn ve diğ., 2010).

2.3. MİKRORNA

MikroRNA (miRNA)'lar gen anlatımını düzenleyen 20-23 nükleotid uzunluğundaki endojen, kodlanmayan ve tek iplikli RNA molekülleridir. İlk kez 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ta rapor edilmiş olup, 2001 yılına kadar miRNAların düzenleyici görevleri kabul görmemiştir (Lee ve diğ., 1993). Günümüzde birçok farklı organizmadan binlerce miRNA tanımlanmıştır. miRNA ile hedef mRNA arasında gerçekleşen nükleotid eşleşmesi sonucu mRNA'nın degradasyonu veya translasyonun engellenmesi sağlanır (Sassen ve diğ., 2008).

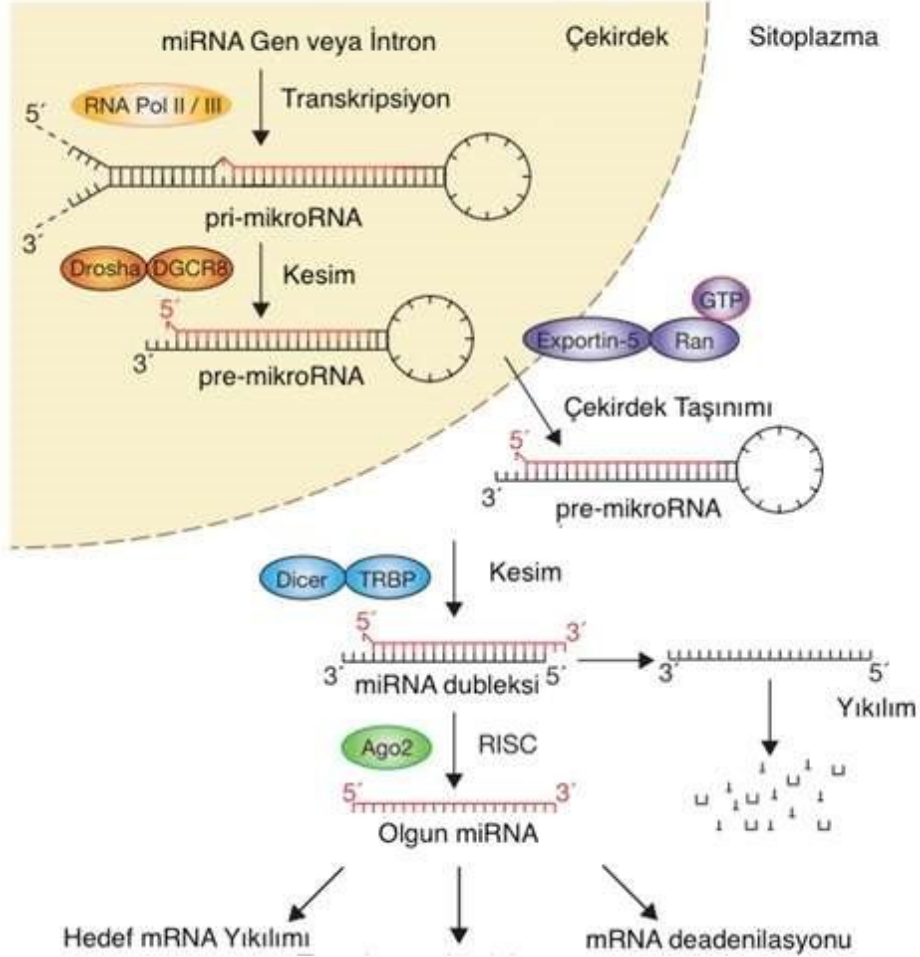
Son yıllarda gerçekleştirilen proteomik çalışmaları, tek bir mRNA'nın yüzlerce hedefi etkileyebileceğini göstermiştir. MiRNA'ların düzenleyici etkileri sayesinde onkogenik ve gelişimsel süreçler gibi birçok hücresel yolak etkilenir. MiRNA biyogenezinde meydana gelebilecek sorunlar tümörigenezin gelişmesine neden olur (Lee ve diğ., 1993).

2.3.1. MikroRNA Biyogenezi

Olgun miRNA'lar ve Argonoute (Ago) proteinleri, post-transkripsiyonel gen susturmaya aracılık eden RISC'i (RNA İndükleyici Susturma Kompleksi) oluşturur. miRNA ile degrade ve destabilize olacak mRNA'nın baz eşleşmesi sayesinde RISC'e yönlendirilir. Tüm olgun miRNA'ların biyogenezi için evrensel olduğu düşünülen lineer miRNA işlem yolu Şekil 2.19'da gösterilmiştir (Winter ve diğ., 2009).

MikroRNA'ların işlenmesinin ilk aşamaları nükleusta gerçekleşir. miRNA genleri RNA polimeraz II veya III tarafından primer miRNA/öncü miRNA (pri-miRNA) transkripsiyonu gerçekleşir. Bu pri-miRNA'ların birçoğunun 3' ucu poliadenile olurken, 5' ucu caplenir. miRNA'ların yaklaşık olarak % 30'u protein kodlayan genlerin intronlarından, diğerleri ise miRNA gen lokuslarından eksprese edilir. Bir pri-miRNA'dan tek bir miRNA oluşabileceği gibi aynı birincil transkriptten köken alan bir miRNA kümesini de oluşturabilirler. Bununla birlikte bu uzun pri-miRNA'lar çift iplikli RNA bağlanma domaini içeren ve bir RNaz III enzimi olan DROSHA-DGCR8 (Pasha) tarafından kesilir. Bu işlem sonrası saç tokası yapısını alan transkript 60-70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'dır ve nükleustan Exportin-5-Ran-GTP ile sitoplazmaya geçer. Sitoplazmada, çift iplikli RNA-bağlayıcı protein (TRBP) ile RNase olan Dicer kompleks oluşturularak, pre-miRNA'lar olgun miRNA uzunluğuna işlenir. Olgun miRNA Argonaute proteinler ile RISC içerisine yerleşir ve mRNA'nın yıkılması, translasyonel olarak baskılanması veya deadenilasyonunu sağlar. miRNA'nın kompleks

içerisine girmeyen diğer zinciri ise yıkılır (Şekil.2.19). MikroRNA'ların işlenmesi için bahsi geçen yolak evrensel olsa da farklı işlemlerle olgun miRNA yolları da mevcuttur (Sassen ve diğ., 2008; Winter ve diğ., 2009).



Şekil 2.19: mikroRNA biyogenezi (Winter ve diğ., 2009).

2.3.2. MikroRNA Fonksiyonları

MikroRNA'lar hem bitkilerde hem de hayvanlarda birçok kilit rol oynar. miRNA'lar gen düzenlenmesinde kilit ve önemli bir rol sağlarlar ve bu nedenle de terapötik hedefler. MiRNA'lar gelişimsel ve fizyolojik süreçlerde evrimsel olarak korunmuş role sahiptir. MiRNA'lar hayvanlarda büyük ölçüde hedef mRNA ile sınırlı komplementerdir fakat bu birçok fizyolojik işlemi düzenlemek için yeterlidir. MiRNA'ların translasyonun başlangıç aşamalarını baskılar ve böylece mRNA degradasyonunu sağlar. Gerçekleştirilen çalışmalarda miRNA'ların

gelişimsel süreçlerde, büyüme ve apoptoz ile ilgili süreçlerde rol oynadığı raporlanmıştır. Çalışılmış miRNA'ların biyolojik fonksiyonlarından bazıları tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.5) (Wahid ve diğ., 2010).

Tablo 2.5: miRNA'lar ve biyolojik fonksiyonlarından bazıları (Wahid ve diğ., 2010).

miRNA'lar	Hedef Gen	Biyolojik Fonksiyonlar	Organizma
bantam	HID	Hücre ölümü ve proliferasyon	<i>Drosophila. melanogaster</i>
let-7	lin-41,HBL-1	Gelişimsel zamanlamanın düzenlenmesi	<i>Caenorhabditis. elegans</i>
lin-4	lin-14, lin-28	Fiziksel koşullar ve gelişimsel zamanlama	<i>C. elegans</i>
lsy-6	COG-1	Nöronal hücre geleceği (fate) ve gelişimsel zamanlama	<i>C. elegans</i>
miR-1	HAND 2	Kardiyomiyosit farklılaşması ve proliferasyon	<i>Mus musculus</i>
miR-7	Notch hedefleri	Notch sinyalleşmesi	<i>D. melanogaster</i>
miR-14	Kaspaz	Hücre ölümü ve proliferasyon	<i>D. melanogaster</i>
miR-15a,miR-16-1	Bcl2	B hücreli kronik lenfosit lösemisinin negatif düzenlenmesi	
miR-16	Several	AU zengin element aracılı mRNA instabilitesi	<i>Homo sapiens</i>
miR-17-92	c-Myc,E2F1	B hücre lenfomasında pozitif düzenlenme	<i>H. sapiens</i>
miR-32	Retrovirüs PFV1	Antiviral defans	<i>H. sapiens</i>
miR-143	ERK5	Adiposit farklılaşması	
miR-143, miR-145	Bilinmiyor	Kolonik adenokarsinomanın down regülasyonu	<i>H. sapiens</i>
miR-146	c-Myc, ROCK1	Gelişim ve immün sistem fonksiyonları	<i>H. sapiens</i>
miR-155	PU-1, c-Maf	T hücresi gelişimi ve doğuştan bağışıklık	<i>Mouse</i>
miR-181	Bilinmiyor	Hematopoetik hücre ölümünün (fate) düzenlenmesi	<i>M. musculus</i>
miR-196	HOXA7, HOXB8, HOXC8, HOXD8	Gelişim	<i>M. musculus</i>
miR-223	NFI-A, Mef2c	Granülositik olgunlaşmanın düzenlenmesi	<i>H. sapiens</i>
miR-273	DIE-1	Nöronal hücre geleceği (fate) ve gelişimsel zamanlama	<i>C. elegans</i>
miR-372,miR-373	LATS2		
miR-375	Myotropin	İnsülin salgılanması	<i>M. musculus</i>
miR-430	Bilinmiyor	Beyin morfogenezi	<i>Danio rerio</i>
SVmiRNA'lar	SV40 viral miRNA'ları	Sitotoksik T hücre duyarlılığı	

2.3.3. MiRNA ve Kanser

Hücrelerin anormal olarak çoğalmalarının ardından apoptotik özelliklerini de kaybetmeleri sonucunda kanserleşmeden söz edilir. MikroRNA'ların gerek proliferasyon (hücre çoğalması)

ve gerekse apoptoz sürecinde kilit rol oynadıkları bilinmektedir. İnsan kanserinde miRNA ilişkisinin ilk verileri, B hücresi kronik lenfositik lösemi hücrelerinde kromozomun 13q14 bölgesindeki tümör baskılayıcıları tanımlamaya yönelik Croce ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma ile sağlanmıştır. Yaptıkları çalışmada B hücresi kronik lenfositik lösemide, miR-15a ve miR-16-1'i içeren, bu bölgenin olmadığını keşfettiler. Klinik kronik lenfositik lösemi vakalarının çoğunda her iki gende silinmiş veya downregüle olduğu görülmüştür. Sonrasında gerçekleştirilen bir çalışmada bölünmeyen malignant B hücrelerinde ve birçok solid tümörde miR-15 ve miR-16-1'in Bcl-2'yi baskılanması ile apoptozu teşvik ederek tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Farelerde yapılan miR-15 ve miR-16-1 kümesinin delesyonu kronik lenfosit lösemisi ile ilişkili fenotiplerde bu iki miRNA'nın tümör baskılanmasında kritik rol oynadığını göstermiştir. Bu çalışmaları takip eden yıllarda özellikle sekans yöntemi ile ortaya konan, miRNA'ların kanserdeki düzensizliği ve tümör sınıflandırılması, teşhisi ve prognozunda kullanılabileceği ile ilgili doğrudan kanıtlar sağlanmıştır (Peng ve Croce, 2016).

MiRNA'ların kanser sürecindeki düzensizliği miRNA genlerinin amplifikasyon ve delesyonlarına, miRNA'nın transkripsiyonel kontrollerine, epigenetik değişikliklerin düzensizliklerine ve miRNA biyogenezindeki bazı hatalara bağlı olarak gerçekleşebilir (Peng ve Croce, 2016).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE GRUPLANDIRILMASI

Tez çalışmasında kullanılan kan ve doku örnekleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Murat Sayan'dan temin edildi. Çalışma kapsamında serum ve doku örneklerinin gruplandırılmaları Tablo 3.1.'de sunulmuştur.

Tablo 3.1: Deney örneklerinin gruplandırılması.

	HBV DNA	HSK Tanısı	Cinsiyet Dağılımı	Yaş Aralığı	Örnek Tipi	Örnek Adedi
Kontrol Grubu	-	-	14 Erkek/ 6 Kadın	30-53	Serum	20
Deney Grubu 1	+	-	13 Erkek/ 7 Kadın	24-60	Serum	20
Deney Grubu 2	+	+	18 Erkek/ 2 Kadın	40-77	Serum	20
Deney Grubu 3	+	+	18 Erkek/ 2 Kadın	40-77	Doku*	20

Her bir hastaya denek kodu verildi. Örneklerin transferleri kuru buz ile gerçekleştirilip, temin edilir edilmez doğrudan izolasyon işlemlerine tabii tutuldu. İzole edilen örneklerin kısa süreli saklanmaları -20 °C'de, uzun süreli saklanmaları ise -80 °C'de gerçekleştirildi.

3.2. NÜKLEİK ASİTLERİN (DNA/RNA) İZOLASYONLARI

Moleküler düzeydeki analizlere (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu vb) başlamadan önce verimli bir şekilde total RNA'nın izole edilmesi gereklidir. Bu nedenle hem HBV pozitif serum örneklerinden hem de HBV pozitif karaciğer doku örneklerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon veriminin daha da iyileştirilmesi amacıyla Trizol ile ön bir işlem gerçekleştirilerek örnek içinde yer alan organik moleküller uzaklaştırıldı.

*Deney grubu 3, deney grubu 2'de yer alan bireylerin toplamda 20 adet formalin ile fikse edilmiş parafine gömülü karaciğer biyopsisi örneklerini içerir.

3.2.1. Total RNA İzolasyonu

Çalışmada serum ve parafin doku örneklerinden total RNA izolasyonunda ticari kitlerden (Anatolia Geneworks, Magrev Total RNA Extraction Kit) yararlanıldı. Doku örneklerinden parafin yapının uzaklaştırılması için ksilen kullanıldı. Parafine gömülü doku örneklerinden 30 mg temiz tüplere aktarıldı ve üzerlerine parafini çözdürmek amacıyla 750 µL ksilen ilave edildi. Ksilenin parafin bloğu çözmesi sırasında doku belli aralıklarla karıştırıldı, parafin yapının çözülmesi göz ile izlendikten sonra 12500 devir/dakika hızda 3 dakika santrifüjlendi ve çöktürme işlemi sonrasında çökelti 1 mL yıkama (W1) tamponu-1 ile bir kez yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında tüp 12500 devir/dakika hızda 3 dakika tekrar santrifüj edildi ve çökelti üzerine 400 µL doku parçalama (LTX) tamponu ve 20 µL proteiniase K eklenip iyice karıştırıldıktan sonra tüpü ağzı sıkıca kapatılarak her 5 dakika aralıklarla tüpler alt üst edilerek 56 °C’de 45 dakika dokunun parçalanması sağlandı. Bu aşamada doku gözle kontrol edilip aralıklarla karıştırıldı. Isıtıcıdan alınan tüpler soğutulduktan sonra 12500 devir/dakika hızda 5 dakika santrifüjlendi. Örneklerin üst fazı temiz bir tüpe aktarıldıktan sonra total RNA izolasyonu aşamasına geçildi. Gerek parafin dokulardan elde edilen üst faz gerekse serum örneklerinden Magrev izolasyon standına alındılar ve kit ile total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Gerçekleştirilen total RNA izolasyonu sonrası RNA konsantrasyon ve saflık ölçümleri spektrofotometrede (IMPLEN, P300) gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Viral DNA İzolasyonu

Serumda HBV DNA’nın kantitasyonunun belirlenmesi hem çalışma grubunun oluşturulması için hem de miRNA’ların HBV DNA kantitasyonu ile korelasyonunun belirlenmesi sebebiyle önemli bir aşamadır. HBV DNA kantitasyonu için GZ PZR çalışmalarından önce serumdan viral DNA izolasyonu gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla serum örneklerinden viral DNA’nın izolasyonu için ticari bir kit (Anatolia Geneworks, Magrev Viral DNA/RNA Extraction Kit) kullanıldı ve üreticinin belirttiği yöntemle göre protokol gerçekleştirildi.

3.2.3. MiRNA İzolasyonu

Temin edilen parafine gömülü doku örnekleri öncelikle parafin bloğun uzaklaştırılması için ksilen ile muamele edildi (Bölüm 3.2.1). Parafin yapı uzaklaştırılan doku örneği (üst faz) ve

serum örneği miRNA izolasyonu ticari bir kit (Anatolia Geneworks, Magrev miRNA Extraction Kit) ile gerçekleştirildi. Bu aşamadan önce miRNA izolasyonunun sağlıklı bir şekilde gerçekleştiğini kontrol etmek için iç kontrol olarak her bir tüpe (doku ve serum) 5 µL başka bir organizmanın (*Arabidopsis thaliana*) miRNA dizisi eklendi (Li ve diğ., 2010).

3.3. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

miRNA'ların ters transkripsiyon-PZR ile elde edilen ürünler, % 2.5'lik agaroz jel elektroferiz ile kontrol edildi. Bu amaçla, 1.25 gr agaroz ve 50 mL Tris-Borat (TBE) tamponu içerisinde (Tablo 3.2) kaynatılarak çözündürüldü (Voytas, 1998). Sonrasında çözelti soğutuldu (65-70 °C) ve üzerine 0.5 µg/mL final konsantrasyonda etidyum bromür eklendi. Çözelti kasetlere döküldü ve katılaşması sağlandı.

Tablo 3.2: TBE Tampon İçeriği.

10 x TBE Tamponu	
Tris base	108 gr
Borik asit	55 gr
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	40 mL
dH ₂ O	1 L

Elektroforez işlemi TBE tamponunda gerçekleştirildi. Ters transkripsiyon-PZR sonucu çoğaltılan miRNA örnekleri 1'e 9 oranında yükleme tamponu (1:10) ile karıştırılarak jele uygulandı (Tablo 3.3). Elektroforez işlemi 80 Voltta 60 dakika gerçekleştirildi.

Tablo 3.3: Örnek Yükleme Tamponu İçeriği.

Örnek Yükleme Tamponu 10X, 100 mL	
Bromofenol Mavisi	250 mg
Tris pH 7,6 (150 mM)	33 mL
Gliserol (≥%99,5)	60 mL
dH ₂ O	7 mL

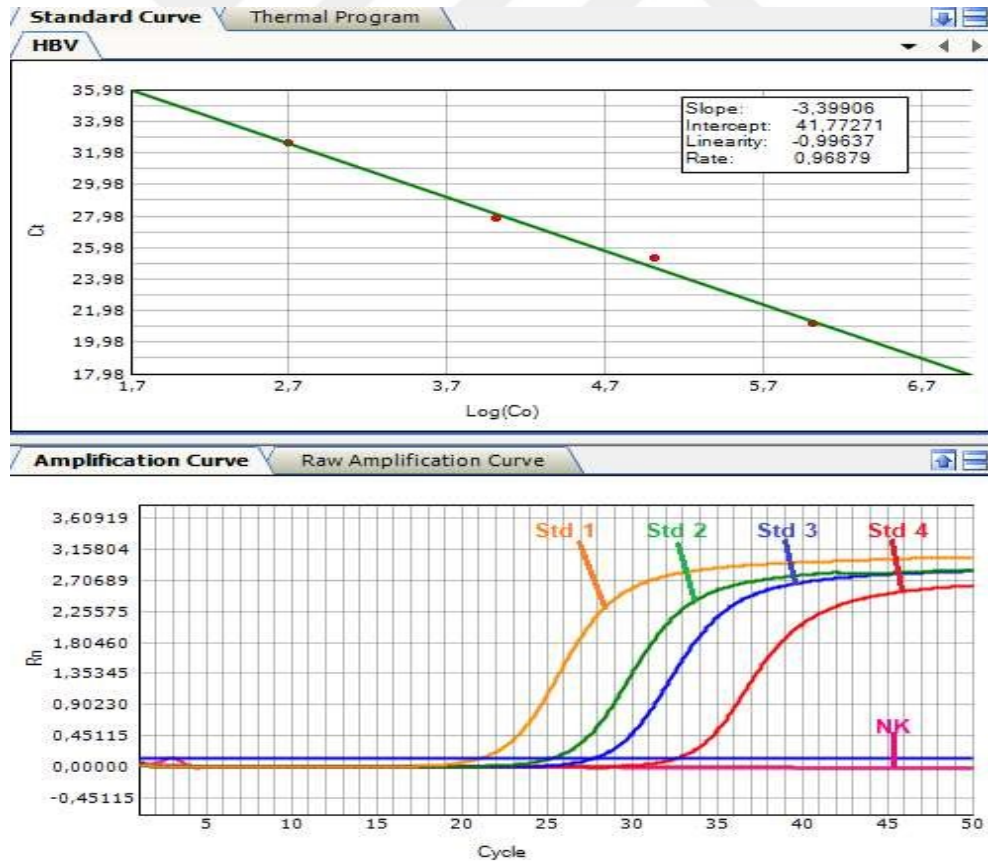
3.4. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GZ-PZR) ANALİZLERİ

Elde edilen HBV DNA, miRNA ve kontrol olarak kullanılan Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH) mRNA miktarları GZ-PZR ile analiz edildi.

3.4.1. HBV DNA GZ-PZR Analizleri

Çalışılan serum örneklerinden HBV DNA'nın kantitasyon işlemleri ticari bir kit (Anatolia Geneworks, Bosphore Ultra HBV Quantitation/Detection Kit) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ticari kitin analitik hassasiyeti 16 kopya/mL (3.6 IU/mL) ve lineer aralığı ise $45-4,5 \times 10^9$ kopya/mL ($10-10^9$ IU/mL)'dir.

Serumda HBV DNA kantitasyonunu belirleyebilmek için kullanılan ticari kitlerde kantitasyon değeri bilinen standartlar kullanılır. Bu standartların her birinin kaç IU/mL veya kopya/mL HBV DNA'sı içerdiği bilinmektedir. GZ-PZR reaksiyonu sonrasında standartlarda meydana gelen ışıma verileri toplanarak Ct değerleri ve konsantrasyon (kantitasyon) verileri ile bir standart eğri çıkartılır ve örnekteki ışımların Ct değerlerinin bu eğrideki yeri ile kantitasyonu belirlenir. Bu amaçla her çalışma için üreticinin belirttiği yöntem ile en az 4 standart ve bir adet negatif kontrol kullanılarak serum örneklerin kantitasyonları gerçekleştirildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: HBV DNA Standart ve negatif kontrol amplifikasyon eğrisi ile standart eğri (Std: standart, NK: Negatif kontrol).

HBV DNA analizi için ticari kitteki yönergeye göre hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 3.4.'de verildi.

Tablo 3.4: Bosphore Ultra HBV Quantification/Detection Kit mix örnek çalışma hacimleri.

PCR Master Mix	45 µL
Örnek DNA'sı (Standart/Negatif/Pozitif Kontrol)	30 µL
Toplam Hacim	75 µL

Karışımlar hazırlandıktan sonra tüpler 1-2 saniye santrifüj edildi ve reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon Tablo 3.5.'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.5: HBV DNA GZ-PZR koşulları

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95 °C	14:30
Denatürasyon	97 °C	00:30
Bağlanma ve Sentez (50 döngü)	54 °C (florasan veri toplama)	01:30
Soğuma	22 °C	01:00

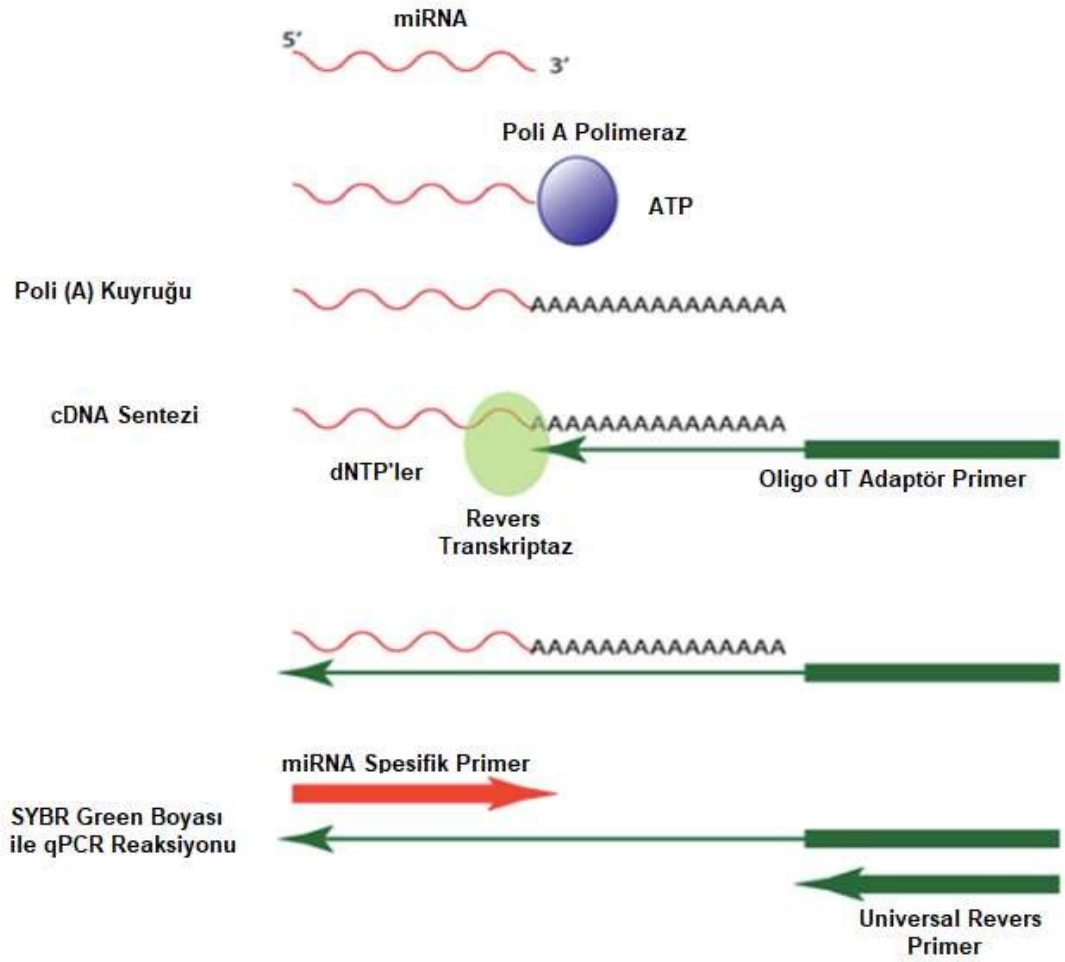
3.4.2. MiRNA GZ-PZR Analizleri

İzole edilen doku ve serum örneklerinde miRNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra miRNA GZ-PZR çalışmalarına başlandı. Gerçekleştirilen çalışmalarda miR-16, miR-28, miR-122, miR- 221, miR-224 ve miR-501 miRNA'ları amplifiye edildi. Çalışılan miRNA'ların ve primerlerin sekansları Tablo 3.6' da gösterilmiştir. MiRNA'ların cDNA'ya çevrilmesinde ticari kit (Quanta Biosciences, qScript microRNA cDNA Synthesis Kit) kullanılmıştır.

Tablo 3.6: miRNA ve primerlerin dizileri.

miRNA adı	miRNA Dizileri	miRNA Spesifik Primerlerin Dizileri
hsa-miR-16	5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3'	F: 5'-CGCCATAGCAGCACGTAAAT -3'
hsa-miR-28	5'-CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA-3'	F: 5'-AGATTGTGAGCTCCTGGAAAAA-3'
hsa-miR-122	5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3'	F: 5'-TGGAGTGTGACAATGGTGTTTG-3'
hsa-miR-221	5'-AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC-3'	F: 5'-GCGAGCTACATTGTCTGCTG-3'
hsa-miR-224	5'-CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU-3'	F: 5' -GCAAGTCACTAGTGGTTCCGTTA- 3'
hsa-miR-501	5'- AAUGCACCCGGGCAAGGAUUCU-3'	F: 5'-ACCCGGGCAAGGATTCTA-3'
Universal R- Primer		R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

MiRNA'ların amplifikasyonları 3 aşamalı reaksiyon ile gerçekleştirildi. Öncelikle olgun miRNA'lara poli A polimeraz ile poli (A) kuyruğu eklendi. Poli A reaksiyonu sonrasında elde edilen ürüne revers transkriptaz ve dNTP'ler ile birlikte poli A kuyruğunun karşılık oligo dT adaptör primer ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Adaptör primer aynı zamanda kullanılan universal revers primerin komplementer dizisini de içermektedir (Şekil 3.2). Sonrasında elde edilen cDNA için Tablo 3.9.' da belirtilen miRNA spesifik ticari primerleri (Quanta Biosciences) ve PZR miksi içerisinde yer alan SYBR Green boyası ile GZ-PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. SYBR Green boyası çift iplikli DNA'ya bağlanma özelliği sayesinde pzs ürünlerine bağlanır ve GZ-PZR'de ışıma verir. Daha sonra pzs ürünleri için erime eğrisi analizi uygulandı.



Şekil 3.2: miRNA amplifikasyon reaksiyonları

Her bir miRNA'ya poli (A) kuyruğu ekleme reaksiyonu için aşağıda tabloda verilen bileşen ve hacimleri eklenerek karışım oluşturuldu (Tablo 3.7) ve 0.2 mL'lik tüp önce 1-2 saniye santrifüj edildi ve 37 °C'de 60 dakika ardından da 70 °C'de 5 dakikada poli A kuyruğu sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3.7: Poli (A) kuyruğu ekleme reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Konsantrasyon	Kullanılan Hacim (µL)
Poli (A) Tailing Buffer	5x	2 µL
Poli (A) Polimeraz	-	1 µL
Total RNA	100 ng-1ug	7 µL
Toplam Hacim		10 µL

Gerçekleştirilen poli (A) kuyruğu reaksiyonu sonrasında cDNA sentezi için Tablo 3.8'deki bileşenler ve hacimleri ile karışım oluşturulup 42 °C'de 20 dakika, 85 °C'de 5 dakika cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3.8: miRNA'ları cDNA'ya çevirmek için kullanılan reaksiyon bileşen ve hacimleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılan Hacim (µL)
Poli (A) Kuyruk Ekleme Reaksiyonu	10 µL
microRNA cDNA Reaksiyon mixi	9 µL
qScript Reverse Transkriptaz	1 µL
Toplam Hacim	20 µL

cDNA'ya çevrimi sağlanan miRNA'ların GZ-PZR amplifikasyonları için ise Quanta Biosciences, microRNA PCR Assay Kitleri kullanıldı. miRNA'ların GZ-PZR ile çoğaltılmaları için reaksiyon karışımı Tablo 3.9'da belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 3.9: miRNA'ları çoğaltmak için kullanılan reaksiyon bileşen ve hacimleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Konsantrasyon	Kullanılan Hacim (µL)
PerfeCTa SYBR Green SuperMix	2X	25 µL
MikroRNA F- Primer	10 µM	1 µL
PerfeCTa Universal R Primer	10 µM	1 µL
mikroRNA cDNA	1-10 ng total RNA	23 µL
	Toplam Hacim	50 µL

Karışım hazırlandıktan sonra tüpler 1-2 saniye santrifüj edildi ve reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon Tablo 3.10'da belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.10: miRNA GZ-PZR koşulları.

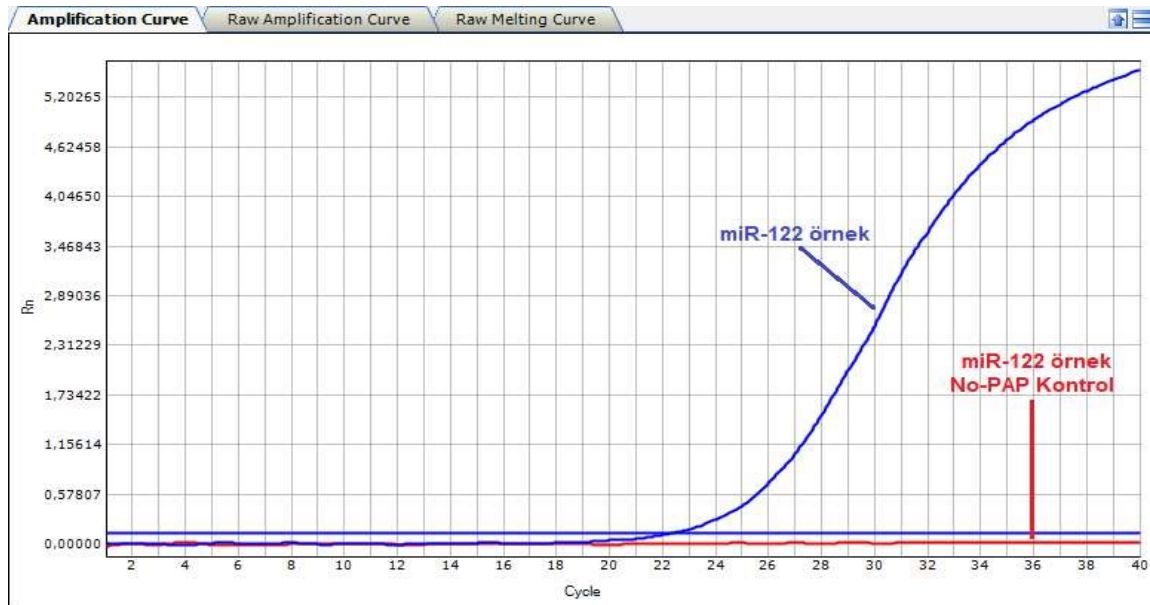
Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre
Taq Polimeraz Aktivasyonu	95 °C	02:00
	95 °C	00:05
PZR Reaksiyonu	60 °C	00:15
(50 döngü)	70 °C	00:15
Erime Eğrisi	50-90 °C	

Gerçekleştirilen tüm miRNA çalışmaları için amplifikasyonların doğruluğunu kontrol etmek amacıyla her bir örnek için poli (A) polimeraz eklenmeyen ayrı bir tüp çalışıldı. Bu tüp içerisinde sadece ilk aşama Tablo 3.11’de sunulan şekilde gerçekleştirildi. Bu tüpteki kontrole poli (A) eklenmeyen (No-PAP) kontrol olarak isimlendirildi ve sonraki her aşama (cDNA ve miRNA amplifikasyonu) diğer tüpler ile aynı koşullarda devam ettirildi. Kullanılan ticari kit yönergelerine göre miRNA amplifikasyonu ve No-PAP kontroller arasında 11 Ct’den daha az farklılık gösteren reaksiyonlar tekrar edilip primer dimerler veya genomik DNA kontaminasyonu her miRNA ve her örnek için değerlendirildi.

Tablo 3.11: No-PAP kontrol reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Konsantrasyon	Kullanılan Hacim (µL)
Poli (A) Tailing Buffer	5x	2 µL
dH ₂ O	-	1 µL
Total RNA	100 ng-1µg	7 µL
Toplam Hacim		10 µL

Şekil 3.3’de grup 1 örneklerinden miR-122 amplifikasyonu ile aynı örneğin No-Pap GZ-PZR çalışması gösterilmiştir.



Şekil 3.3: miRNA örnek ve No-PAP kontrolü GZ-PZR ışımaları

3.4.2.1. MiRNA Normalizasyonu

Biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin değerlendirildiği miRNAların referans olarak mRNA'larda kullanılan referans genler yerine yine düşük baz sayılarında ve doku ve örnek tipine özel bazı RNA molekülleri ile normalize edilip farklı örneklerde gen anlatımının daha düşük mü yoksa daha yüksek mi olduğuna karar verilebilir. Bu amaçla izole edilen doku ve serum örneklerinde U6 snRNA kullanıldı (Peltier ve Latham, 2008). Aynı zamanda normalizasyon için SnoRNA U44 (SNORD44) ve GAPDH de denendi (Mase ve diğ., 2017). U6 için Tablo 3.12'de verilen primer dizileri kullanıldı. SNORD U44 primerleri için ticari kitin (Quanta Biosciences, qScript microRNA cDNA Synthesis Kit) pozitif kontrollerinin primerleri kullanıldı.

Tablo 3.12: SnRNA U6 primer dizileri.

Primer Dizisi	
SnRNA U6	F: 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
	R: 5'-AAATATGGAACGCTTCACGA -3'

3.4.2.2. MiRNA İç Kontrolü

İzolasyona başlamadan önce örneklerin içerisine miRNA'ların izolasyonlarının gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek için başka bir organizmanın (*Arabidopsis thaliana*) miRNA dizisi sentetik olarak izole edilecek örneğin içerisine (doku ve serum) eklendi (Li ve diğ., 2010). Ath-168a için Tablo 3.13'de belirtilen primerler ve ath-168a sekansı kullanıldı.

Tablo 3.13: Ath-168a primer dizileri.

Primer Dizisi	
Ath miR-168a	5'-UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA-3'
Ath miR-168a	F: 5'-GTTTTTCGCTTGGTGCAGGT-3'
Universal R-Primer	R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

GZ-PZR amplifikasyonu Quanta Biosciences, microRNA PCR Assay Kit ile gerçekleştirildi.

3.4.3. GAPDH mRNA'nın GZ-PZR Analizleri

İzole edilen örneklerdeki GAPDH mRNA düzeyü GZ-PZR'de amplifikasyonunu sağlamak amacıyla (GAPDH) (referans) gen bölgesi primerleri ile amplifikasyon ticari bir kit (Quanta Biosciences, qScript One Step SYBR Green qRT-PCR) ile gerçekleştirildi. cDNA sentezi ve sonrasında cDNA'ları çift iplikli hale getirip çoğaltmak tek tüpte tek bir aşamada gerçekleşmektedir. Bu amaçla kullanılan GAPDH primerleri Tablo 3.14.'de verildi.

Tablo 3.14: GAPDH primerleri.

Gen Adı	Primer Dizisi
GAPDH	F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Tablo 3.15: GAPDH gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan reaksiyonun basamakları.

Reaksiyon Bileşenleri	Konsantrasyon	Kullanılan Hacim (µL)
One-Step SYBR Green Master Mix	2X	12,5 µL
GAPDH Primer	10 µM	1 µL
qScript One-Step RT	-	1 µL
Total RNA	-	5 µL
Nuclease free water	-	5.5 µL
	Toplam hacim	25 µL

Tablo 3.15'de verilen mix karışımları hazırlandıktan sonra tüpler 1-2 saniye santrifüj edildi ve reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon Tablo 3.16.'da belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.16: GAPDH GZ-PZR koşulları.

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre
cDNA sentezi	50 °C	10:00
Taq Polimeraz	95 °C	05:00
Aktivasyonu	95 °C	00:10
(45 döngü)	60 °C	00:30
	(floresan veri toplama)	
Erime Eğrisi Analizi	50 °C - 90 °C	

3.5. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (REAL TIME PCR) ΔΔCT ANALİZLERİ

Tez kapsamında hem HBV DNA'larının hem de GAPDH, miRNA analizleri GZ-PZR ile saptanmıştır. Gerçekleştirilen GZ-PZR analizleri Montania 4896 Real Time PCR cihazında (Anatolia Geneworks) gerçekleştirildi. HBV DNA'ların çalışması için prob içeren bir ticari PZR kiti (Anatolia Geneworks, Bosphore Ultra HBV Quantitation/Detection Kit) kullanıldı. miRNA analizleri (miRNA mimik kontrolü, miRNA normalizasyonu ve deney miRNA'ları dahil) ve GAPDH için SYBR Green boyası ile GZ-PZR analizleri yapılmış olup, termal döngü sonrası PZR ürününün doğruluğu için erime eğrisi analizleri yapılmıştır.

Gerçekleştirilen her bir PZR çalışmasında en az 1 adet negatif kontrol (NK) ve her miRNA için No-PAP kontrol çalışmaya dahil edildi. Kontaminasyon kontrolü olarak kullanılan negatif kontrolde herhangi bir çoğalmanın olup olmadığı değerlendirildikten sonra örnek ve kontrol grubu Ct'leri aşağıda yer verilen formül ışığında hesaplandı. HBV DNA çalışması prob içerdiğinden sonrasında erime eğrisi analizine gerek kalmadan doğrudan IU/mL olarak değerler kitin içerisinde bulunan ve kantitatif değeri bilinen 5 adet standart ve 3 adet kontrol ile yazılım tarafından otomatik olarak hesaplandı. SYBR Green ile çalışılan miRNA'lar ve GAPDH referans gen ise GZ-PZR reaksiyonu sonucunda her biri ayrı tüpte olacak şekilde çalışıldı ve her bir PZR ürünü erime eğrisi analizi ile de ayrıca kontrol edildi.

Kantitatif GZ-PZR, gen ekspresyon seviyelerini kantite etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. GZ-PZR verilerini analiz etmek için mutlak (absolüt) ve göreceli (rölatif) olmak üzere iki farklı strateji vardır. Mutlak kantitasyonda gen miktarı bir standart eğriye göre kantite edilir. Göreceli kantitasyonda ise ekspresyonu ölçülen gen miktarı referans bir numuneye göre belirlenir.

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi en sık kullanılan yöntemdir. Eşik döngüsü (Ct) floresan seviyenin belirli bir miktara ulaştığı ve eşiği geçtiği miktarı temsil eder (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu yöntem ile doğrudan hedefin ve normalizasyon için kullanılan referans genin Ct değerlerinden hesaplama gerçekleştirilebilir. GAPDH, β -aktin, 18s rRNA referans gen olarak kullanılabilir (Livak ve Schmittgen, 2001). ΔC_t hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\Delta C_t = C_t (\text{hedef gen}) - C_t (\text{referans gen})$$

ΔC_t 'ler hem deney grubu hem de kontrol grubu için ayrı ayrı hesaplandıktan sonra aşağıdaki formül uyarınca deney ve kontrol grupları arasındaki ekspresyon farklılıkları hesaplanıp ilgili ekspresyonların aşağı veya yukarı yönde düzenlendiği veya ekspresyon analizleri gerçekleştirilebilir.

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{hedef örnekler}) - \Delta C_t (\text{referans örnekler})$$

Göreceli kantitasyonda, referans örneklerinin gen ekspresyonu genellikle 1 kabul edilir, çünkü ΔC_t ve $\Delta\Delta C_t$ 'ler 2 üzeri olarak hesaplanır ve referans örneklerinin kendilerinden çıkarılması sonucu elde edilen 0 aslında 2^0 yani 1 demektir. Ayrıca bu yöntemde tüm örneklerde PZR amplifikasyon veriminin %100 olduğu düşünülür. Böylece yöntemin gerçekleştirilmesi kolaylaşır, optimal koşullarda ve PCR inhibitörlerinin olmadığı durumlarda bu yöntem uygulanabilir.

GZ-PZR için uygulanabilen diğer bir göreceli kantitasyon yönteminde ise yine $\Delta\Delta C_t$ kullanılır. Fakat bu yöntemde diğer yöntemin aksine PZR verimi % 100 olarak alınmaz, PZR ürünlerinden bir dilüsyon oluşturulup PZR verimi ayrıca hesaplanıp sonrasında 2 üzeri olarak hesaplanan ΔC_t PZR verimi üzeri ΔC_t olarak hesaplanır (Pfaffl, 2001). Formülü ise aşağıdaki gibidir (Şekil 3.4).

$$\text{Oran} = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta C_t \text{ hedef (kontrol-deney)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_t \text{ ref (kontrol-deney)}}$$

Şekil 3.4: GZ-PZR sonuçlarının yorumlanmasında PFAFFL denklemi.

3.6. İSTATİKSEL ANALİZLER

Deneylere ait tüm GZ-PZR sayısal verileri kontrole ve birbirlerine göre istatistiksel olarak GraphPad Prism yazılım programı (GraphPad Prism version 7.0, GraphPad Software, San Diego, California USA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla elde edilen verilere tek

yönlü ANOVA testi uygulandı Grupların kontrol grubuna göre anlamlılıkları t testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ seviyesi anlamlılık değeri temel alındı.

Her bir miRNA için hassasiyet ve özgüllük (ROC) analizleri kontrol ve deney grubu 2 (HBV ve HSK Pozitif Serum) örnekleri MedCalc yazılım programı (MedCalc, version 18.11.6, Acaciaaan, Ostend, Belgium) kullanılarak değerlendirildi. % 95 CI (güven aralığı) değerleri bu program tarafından analizlendi.

3.7. PATOLOJİK İNCELEMELER

Normal karaciğer dokuları ve HSK teşhisi konulmuş karaciğer dokuları Hematoksilin ve Eozin (H&E) boyama metodu ile boyanmıştır. Bu analizler Kocaeli Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı tarafından gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

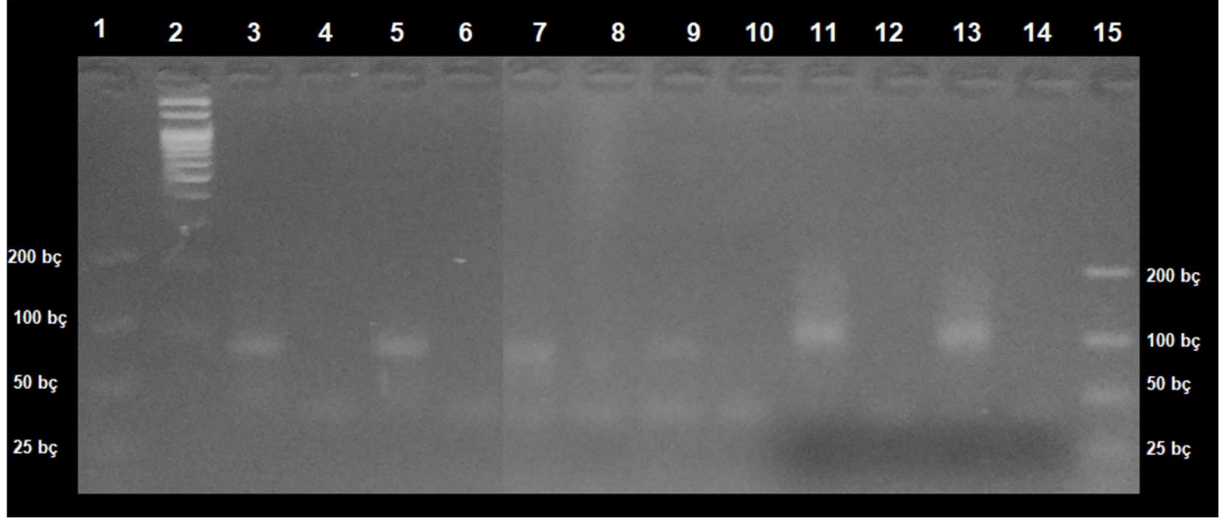
4.1. MİRNA'LARIN İZOLASYON ANALİZLERİ

Yapılan miRNA izolasyonları sonucunda elde edilen izolatların ölçümü sonrasında serumda 6.87 ng/ μ L ile 42 ng/ μ L arasında, parafine gömülü biyopsi örneklerinde ise 28.90 ng/ μ L ile 55.20 ng/ μ L arasında konsantrasyonlar saptanmıştır.

Yine elde edilen izolatların saflıkları (A260/280) ise serum örnekleri için 1.78 ile 2.00, parafine gömülü biyopsi örnekleri için ise 1.91 ile 2.00 arasındadır. İzolasyon çalışması manuel manyetik izolasyon protokolü ile gerçekleştirilmiştir.

4.1.2. MiRNA Agaroz Jel Elektroforezi Analizleri

Spektrofotometrik analizleri yapılan miRNA'lar Bölüm 3.7.'de anlatılan şekilde cDNA'ya çevrildi ve ardından PZR ile çoğaltıldı. Elde edilen PZR ürünlerinden seçilen 1 doku ve 1 serum örneğinin 4 miRNA için (miR-16, miR-28, miR-122 ve miR-501) ve snRNA U6 için toplamda 12 tanesine Bölüm 3.4.'te anlatılan şekilde agaroz jel elektroforezi uygulandı. Elektroforez sonucunda elde edilen miRNA bantları Şekil 4.1.'de sunuldu.



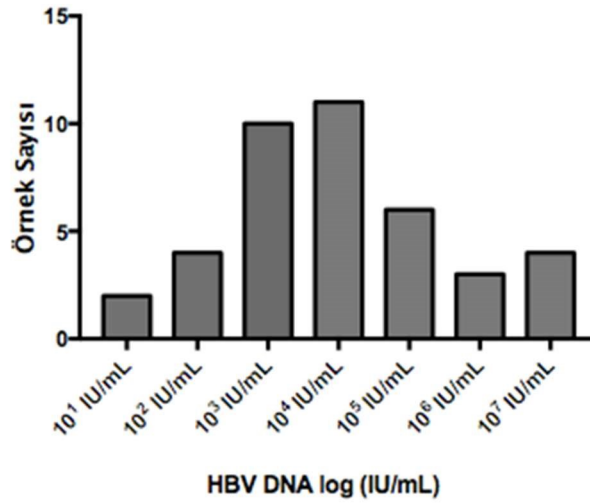
Şekil 4.1: İzole edilen örneklerin % 2,5'lik Agaroz Jel Sonuçları (1.FastRuler Ultra Low Range DNA Ladder, 2.Biotech rabbit 100 bp ladder, 3. Doku miRNA-122, 4. Doku miRNA-122 No-PAP kontrol, 5. Doku miRNA-28, 6. Doku miRNA-28 No-PAP kontrol, 7. Serum miRNA-16, 8. Serum miRNA-16 No-PAP kontrol, 9. Serum miRNA-501, 10. Serum miRNA-501 No-PAP kontrol, 11. Serum U6 kontrol, 12. Serum U6 No-PAP kontrol, 13. Doku U6 kontrol, 14. Doku U6 No-PAP kontrol, 15. FastRuler Ultra Low Range DNA Ladder.

Gerçekleştirilen % 2.5'lik Agaroz Jel sonuçlarına da uygun olarak miR-16, miR-28, miR-122 ve miR-501 için 88-90 bç arasında ve normalizasyon için kullanılan snRNA U6 için 100 bç'lik bir ürün elde edilmiştir. Bu sonuçlar nükleotid karşılaştırma analizleri ile uyumludur.

4.2.GERÇEK ZAMANLI PZR ANALİZLERİ

4.2.1. HBV DNA Gerçek Zamanlı PZR Analizleri

Viral DNA izolasyonu (Bölüm 3.2.2.) gerçekleştirilen serum örneklerinden Bölüm 3.4.2'de bahsedilen şekilde HBV DNA GZ PZR analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin ışığında ortaya çıkan HBV DNA kantitasyon (log) verileri Şekil 4.2'de yer almaktadır.



Şekil 4.2: Serum örneklerinin HBV DNA GZ PZR çalışması kantitasyonları (IU/mL).

HBV DNA'nın klinik olarak değerlendirilmesinde genel olarak logaritmik veriler şeklinde gerçekleştirilir. Şekil 4.2'de yer alan artış verileri Tablo 4.1'de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Tablo 4.1: HBV DNA log verilerinin IU/mL ve kopya/mL konsantrasyon aralığı ve örnek sayısı.

Log verisi	Örnek Sayısı	Konsantrasyon Aralığı	
		IU/mL	Kopya/mL
10 ¹	2	1-99 IU/mL	4,5-445,5 kopya/mL
10 ²	4	100-999 IU/mL	450-4.495,5 kopya/mL
10 ³	10	1.000-9.999 IU/mL	4.500-44.995,5 kopya/mL
10 ⁴	11	10.000-99.999 IU/mL	45.000-449.995,5 kopya/mL
10 ⁵	6	100.000-999.999 IU/mL	450.000-4.499.995,5 kopya/mL
10 ⁶	3	1.000.000-9.999.999 IU/mL	4.500.000-44.999.995,5 kopya/mL
10 ⁷	4	10.000.000-99.999.999 IU/mL	45.000.000-449.999.995,5 kopya/mL

Gerçekleştirilen HBV DNA çalışmalarında 2 örnek 10¹ IU/mL, 4 örnek 10² IU/mL, 10 örnek 10³ IU/mL, 11 örnek 10⁴ IU/mL, 6 örnek 10⁵ IU/mL, 3 örnek 10⁶ IU/mL ve 4 örnek 10⁷ IU/mL olarak kantite edilmiştir.

4.2.2. MiRNA'ların Gerçek Zamanlı PZR Analizleri

MiRNA izolasyonu (Bölüm 3.2.3) gerçekleştirilen serum ve doku (parafine gömülü biyopsi) örneklerinden Bölüm 3.5'de bahsedilen şekilde GZ PZR analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ışığında ΔCt analizi Tablo 4.2.'de yer almaktadır.

Tablo 4.2: İzole edilen örneklerin miRNA ΔCt verileri.

	Kontrol (HBV- HCC -/Serum)	Grup 1 (HBV+ HCC-/Serum)	Grup 2 (HBV+ HCC+/Serum)	Grup 3 (HBV+ HCC+/ Doku)
ΔCt miR-16	7.41	8.13	6.78	-0.9
ΔCt miR-28	8.10	8,52	10,41	17,77
ΔCt miR-122	3.83	9.23	9.78	10.76
ΔCt miR-221	5.66	4.54	6.88	-2.37
ΔCt miR-224	13.91	6.24	10.62	9.15
ΔCt miR-501	4.75	0.35	0.55	-7.87

Elde edilen veriler ışığında kontrol grubuna göre deney gruplarının miRNA $-\Delta\Delta Ct$ verileri ise Tablo 4.3.'de yer almaktadır.

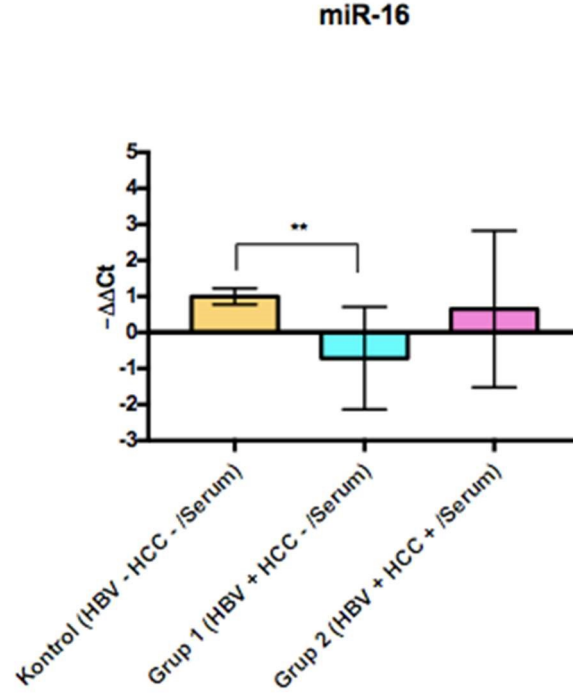
Tablo 4.3: Deney gruplarının miRNA $-\Delta\Delta Ct$ verileri.

	Kontrol (HBV- HCC -/Serum)	Grup 1 (HBV+ HCC-/Serum)	Grup 2 (HBV+ HCC+/Serum)	Grup 3 (HBV+ HCC+/ Doku)
$-\Delta\Delta Ct$ miR-16	1	-0,72	0,63	8,31
$-\Delta\Delta Ct$ miR-28	1	-0,42	-2,31	-9,67
$-\Delta\Delta Ct$ miR-122	1	-5,4	-5,95	-6,93
$-\Delta\Delta Ct$ miR-221	1	1,12	-1,22	8,03
$-\Delta\Delta Ct$ miR-224	1	7,67	3,29	4,76
$-\Delta\Delta Ct$ miR-501	1	4,4	4,2	12,62

Ayrıca çalışması gerçekleştirilen 6 miRNA için gerçekleştirilen normalizasyon sonrası değerlendirmelerde istatistik olarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.2.1. MiR-16 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri

İzolasyonlar sonrası çalışılan kontrol ve deney gruplarından GZ-PZR analizleri Bölüm 3.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucu elde edilen Ct verileri ışığında $-\Delta\Delta Ct$ ’ler Şekil 4.3’de yer almaktadır.

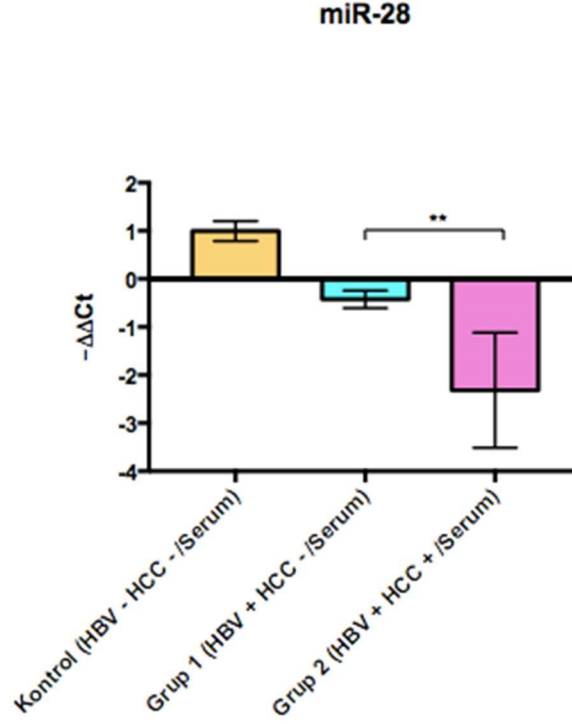


Şekil 4.3: miR-16 $-\Delta\Delta Ct$ ve Deney grubu analizleri. Deney 3 kez tekrarlanmıştır ve sütunlar üzerindeki dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir. Grup içerisindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile ($P < 0.0001$, R^2 : 0.8597), deney grupları arasındaki istatistik anlamlılık ise t testi ile belirlenmiştir (Kontrol ve Grup 1 arasında $P < 0.0015$).

Gerçekleştirilen $-\Delta\Delta Ct$ analizleri ışığında kontrol grubu ile deney grubu 1 arasında miRNA-16 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu anlaşılmaktadır.

4.2.2.2. MiR-28 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri

İzolasyonlar sonrası çalışılan kontrol ve deney gruplarından GZ-PZR analizleri Bölüm 3.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucu elde edilen Ct verileri ışığında $-\Delta\Delta Ct$ ’ler Şekil 4.4’de yer almaktadır.

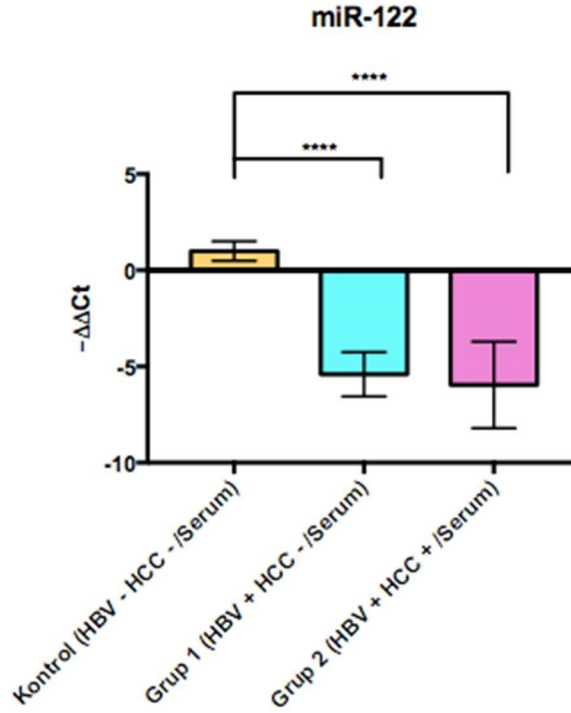


Şekil 4.4: miR-28 $-\Delta\Delta Ct$ ve Deney grubu analizleri. Deney 3 kez tekrarlanmıştır ve sütunlar üzerindeki dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir. Grup içerisindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile ($P < 0.0001$, $R^2: 0.9361$), deney grupları arasındaki istatistik anlamlılık ise t testi ile belirlenmiştir belirlenmiştir (Grup 1 ve Grup 2 arasında $P < 0.001$).

Gerçekleştirilen $-\Delta\Delta Ct$ analizleri ışığında deney grubu 1 ile deney grubu 2 arasında miRNA-28 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir.

4.2.2.3. MiR-122 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri

İzolasyonlar sonrası çalışılan kontrol ve deney gruplarından GZ-PZR analizleri Bölüm 3.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucu elde edilen Ct verileri ışığında $-\Delta\Delta Ct$ ’ler Şekil 4.5’de yer almaktadır.

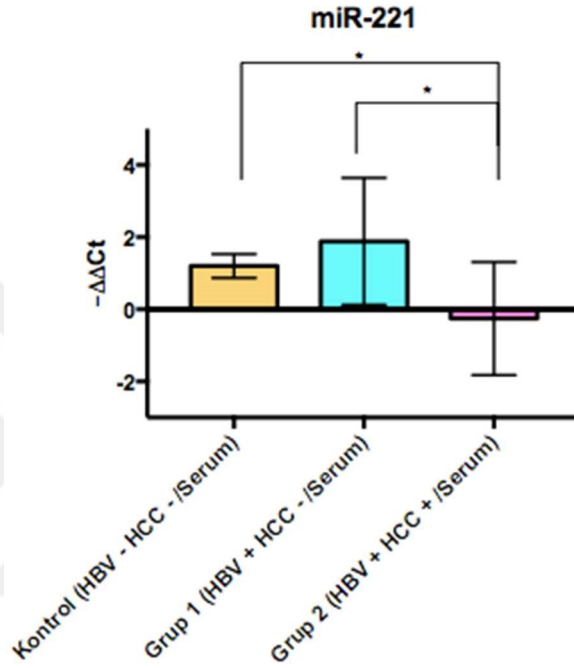


Şekil 4.5: miR-122 $-\Delta\Delta Ct$ ve Deney grubu analizleri. Deney 3 kez tekrarlanmıştır ve sütunlar üzerindeki dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir. Grup içerisindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile ($P < 0.0001$, R^2 : 0.8401), deney grupları arasındaki istatistik anlamlılık ise t testi ile belirlenmiştir (Kontrol ve Grup 1 arasında $P < 0.0001$; Kontrol ve Grup 2 arasında $P < 0.0001$).

Gerçekleştirilen $-\Delta\Delta Ct$ analizleri ışığında kontrol grubu ve deney grubu 1 ile deney grubu 2 arasında miRNA-122 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu ortaya çıkmaktadır.

4.2.2.4. MiR-221 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri

İzolasyonlar sonrası çalışılan kontrol ve deney gruplarından GZ-PZR analizleri Bölüm 3.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucu elde edilen Ct verileri ışığında $-\Delta\Delta Ct$ ’ler Şekil 4.6’de yer almaktadır.

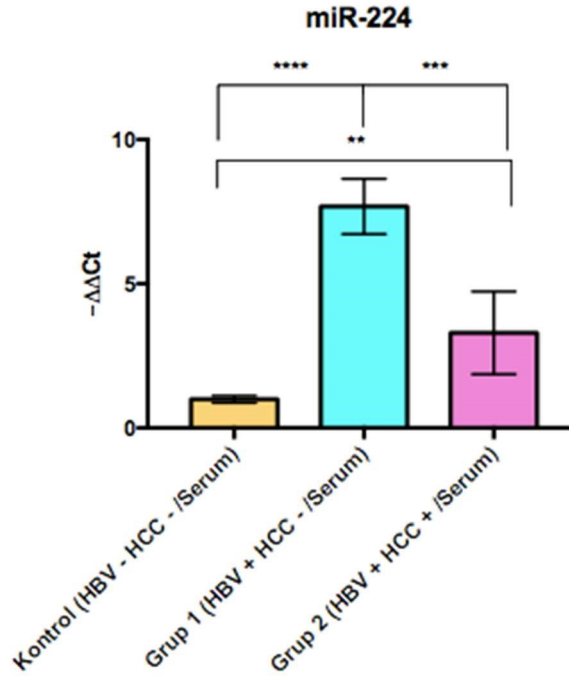


Şekil 4.6: miR-221 $-\Delta\Delta Ct$ ve Deney grubu analizleri. Deney 3 kez tekrarlanmıştır ve sütunlar üzerindeki dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir. Grup içerisindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile ($P < 0.0001$, R^2 : 0.8712), deney grupları arasındaki istatistik anlamlılık ise t testi ile belirlenmiştir (Kontrol ve Grup 2 arasında $P < 0.01$; Grup 1 ve Grup 2 arasında $p < 0.01$).

Gerçekleştirilen $-\Delta\Delta Ct$ analizleri ışığında deney grubu 2 ile kontrol grubu arasında miR-221 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma; deney grubu 2 ile deney grubu 1 arasında miR-221 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir.

4.2.2.5. MiR-224 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri

İzolasyonlar sonrası çalışılan kontrol ve deney gruplarından GZ-PZR analizleri Bölüm 3.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucu elde edilen Ct verileri ışığında $-\Delta\Delta Ct$ ’ler Şekil 4.7’de yer almaktadır.

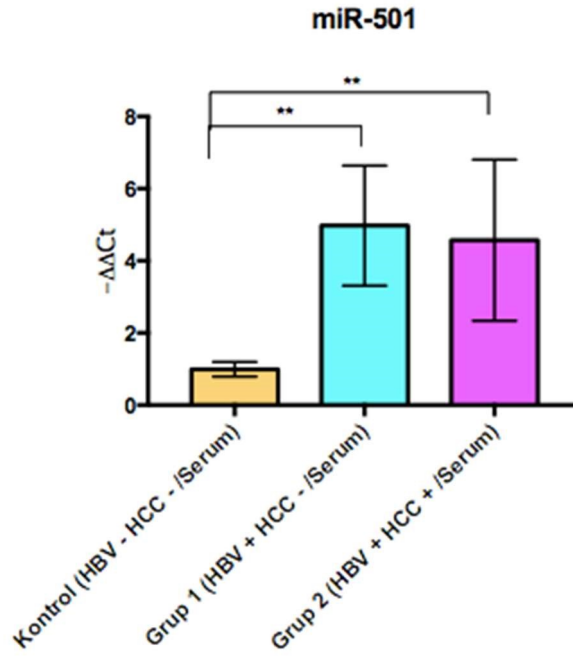


Şekil 4.7: miR-224 $-\Delta\Delta Ct$ ve Deney grubu analizleri. Deney 3 kez tekrarlanmıştır ve sütunlar üzerindeki dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir. Grup içerisindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile ($P < 0.0001$, $R^2: 0.7645$), deney grupları arasındaki istatistik anlamlılık ise t testi ile belirlenmiştir (Kontrol ve Grup 1 arasında $P < 0.0001$; Kontrol ve Grup 2 arasında $P = 0.0055$; Grup 1 ve Grup 2 arasında $P = 0.0004$).

Gerçekleştirilen $-\Delta\Delta Ct$ analizleri ışığında kontrol grubu ve deney grubu 1 ile miRNA-224 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu; kontrol grubu ve deney grubu 2 arasında miRNA-224 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu; deney grubu 1 ile deney grubu 2 arasında yine aynı miRNA’nın ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu görülmektedir.

4.2.2.6. MiR-501 İçin $-\Delta\Delta Ct$ Analizleri

İzolasyonlar sonrası çalışılan kontrol ve deney gruplarından GZ-PZR analizleri Bölüm 3.6’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucu elde edilen Ct verileri ışığında $-\Delta\Delta Ct$ ’ler Şekil 4.8’de yer almaktadır.



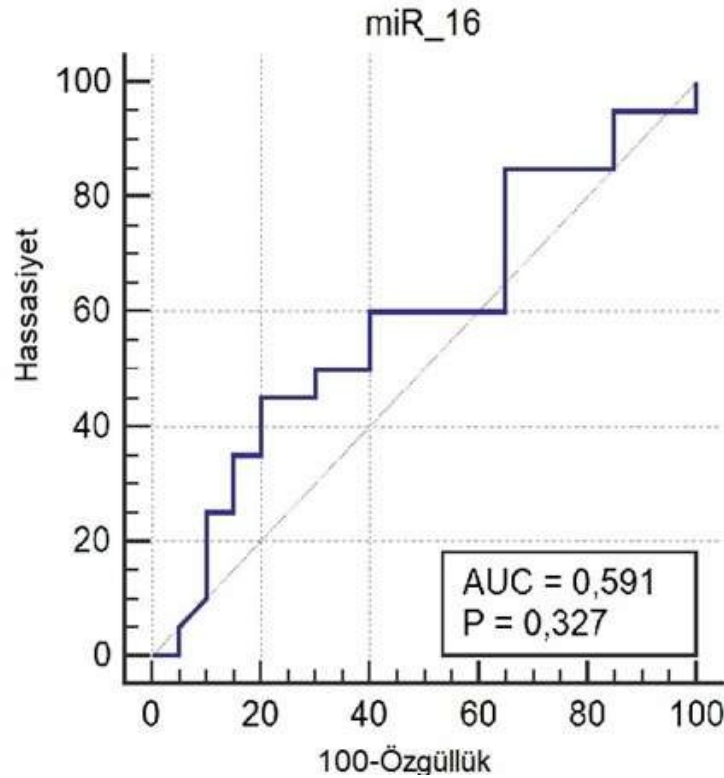
Şekil 4.8: miR-501 $-\Delta\Delta Ct$ ve Deney grubu analizleri. Deney 3 kez tekrarlanmıştır ve sütunlar üzerindeki dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir. Grup içerisindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile ($P < 0.0001$, R^2 : 0.8818), deney grupları arasındaki istatistik anlamlılık ise t testi ile belirlenmiştir (Kontrol ve Grup 1 arasında $P=0.0053$; Kontrol ve Grup 2 arasında $P=0.0211$).

Gerçekleştirilen $-\Delta\Delta Ct$ analizleri ışığında kontrol grubu ve deney grubu 1 ile deney grubu 2 arasında miRNA-501 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu anlaşılmaktadır.

4.2.3. MiRNA'lar İçin Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri

4.2.3.1. MiR-16 İçin Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri

MiRNA-16 için kontrol ve grup 2 (HBV+, HCC+ /Serum) örneklerinin referans gen ile ekspresyon farklılığına göre oluşturulan özgüllük ve hassasiyet analizleri Bölüm 3.10'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir ve veriler Şekil 4.9'da yer almaktadır.

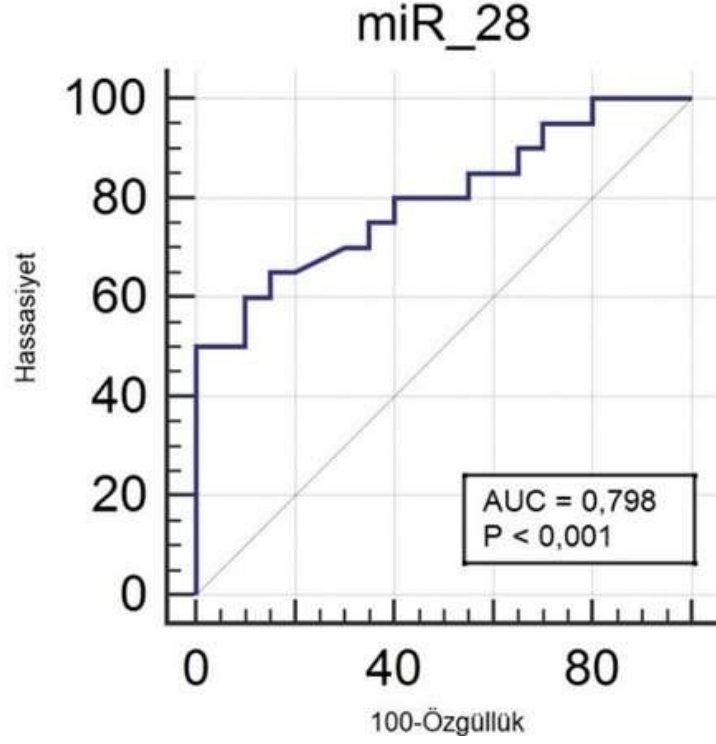


Şekil 4.9: miR-16 ROC analizi. Kontrol grubu (20 serum örneği), Grup 2 (20 serum örneği), AUC: 0.591; %95 CI: 0.42-0.74 ve P:0.327.

Elde edilen verilere göre miR-16 için ROC analiz değerlerinin hassasiyet ve özgüllük için yeterli olmadığı kontrol ve grup 2 deney verileri için yanlış pozitif ve yanlış negatifliklerin fazla olduğu sonucu çıkmaktadır. Elde edilen miR-16 ROC eğrisinin eşik çizgisine çok yakın olması ve hatta bazı noktalarda kesişmeleri bu testin diagnostik olarak kullanımının uygun olmadığı yorumuna neden olmaktadır. Bununla birlikte gerçekleştirilen $-\Delta\Delta C_t$ analizleri de göz önünde bulundurulduğunda kontrol ve deney grupları için anlamlı bir farklılık ortaya çıkmadığı bu analiz sonucuna paralel olarak elde edilmiş bir sonuçtur.

4.2.3.2. MiR-28 için Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri

MiRNA-28 için kontrol ve grup 2 (HBV+, HCC+ /Serum) örneklerinin referans gen ile ekspresyon farklılığına göre oluşturulan özgüllük ve hassasiyet analizleri Bölüm 3.9’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir ve veriler Şekil 4.10’da yer almaktadır.

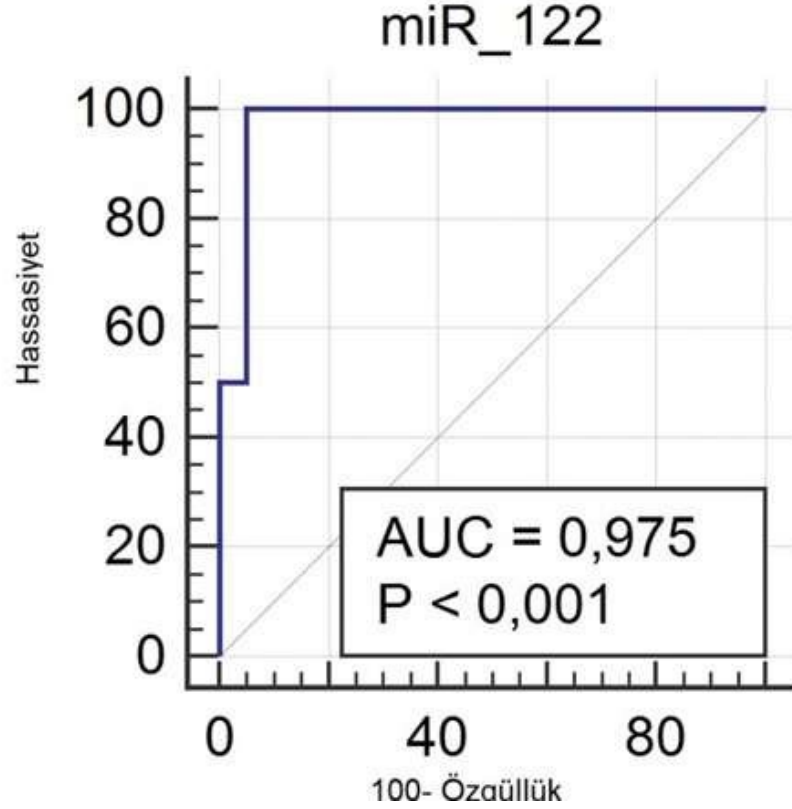


Şekil 4.10: miR-28 ROC analizi. Kontrol grubu (20 serum örneği), Grup 2 (20 serum örneği), AUC: 0.798; %95 CI: 0.64-0.90 ve P<0.001.

Bu tez kapsamında miR-28, kontrol ve grup 1 ile grup 2 arasında istatistiksel anlamlı sonuç ortaya koyan en önemli miRNA’dır. Bu sebeple ROC analizi miR-28 için önemli bir veri sunmaktadır. Elde edilen verilere göre miR-28 için ROC analiz değerlerinin hassasiyet ve özgüllük için uygun olduğu kontrol ve grup 2 deney verileri için yanlış pozitif ve yanlış negatifliklerin azlığı ve miR-28 için ROC eğrisinin eşik çizgisinden uzak olması bu testin diagnostik olarak kullanımının uygun olabileceği yorumuna neden olmaktadır.

4.2.3.3. MiR-122 için Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri

MiRNA-122 için kontrol ve grup 2 (HBV+,HCC+ /Serum) örneklerinin referans gen ile ekspresyon farklılığına göre oluşturulan özgüllük ve hassasiyet analizleri Bölüm 3.9’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir ve veriler Şekil 4.11’de yer almaktadır.

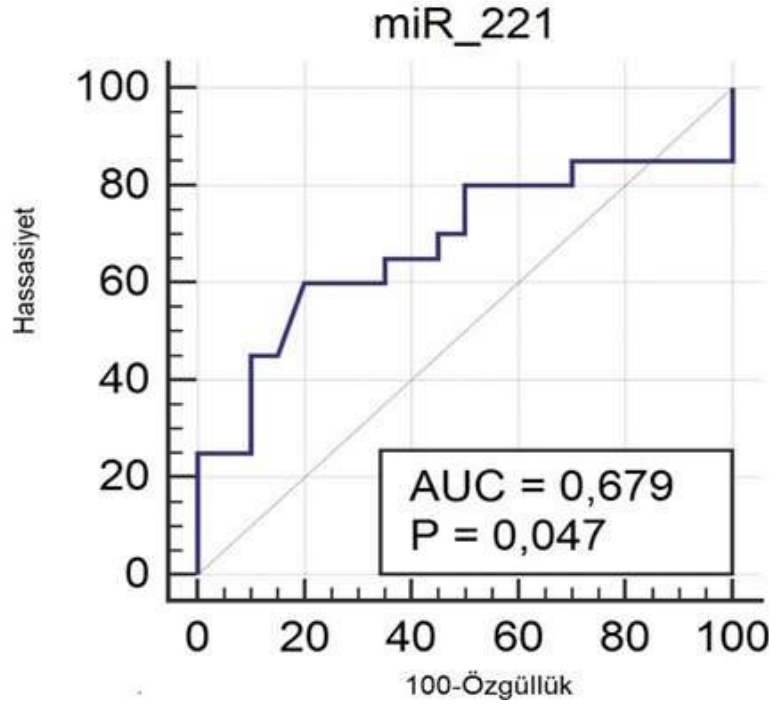


Şekil 4.11: miR-122 ROC analizi. Kontrol grubu (20 serum örneği), Grup 2 (20 serum örneği), AUC: 0.975; %95 CI: 0.86-0.99 ve P<0.001.

MiR-122 için kontrol örnekleri ile grup 1 ve grup 2 arasında ekspresyonlarda azalma istatistiksel olarak anlamlılığı Şekil.4.7’de gösterilmiştir. Bu miRNA için kontrol ve deney grupları arasındaki ekspresyon farklılığı çok fazla olduğundan ROC eğrisinin eşik çizgisinden uzaktadır. Bu da bu miR-122’nin diagnostik olarak kullanımının uygun olabileceği yorumuna neden olmaktadır. Fakat $-\Delta\Delta C_t$ analizleri göz önünde bulundurulduğunda bu parametre grup 1 ve grup 2 arasında anlamlı bir farklılık göstermemektedir.

4.2.3.4. MiR-221 için Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri

MiRNA-221 için kontrol ve grup 2 (HBV+, HCC+ /Serum) örneklerinin referans gen ile ekspresyon farklılığına göre oluşturulan özgüllük ve hassasiyet analizleri Bölüm 3.9’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir ve veriler Şekil 4.12’de yer almaktadır.

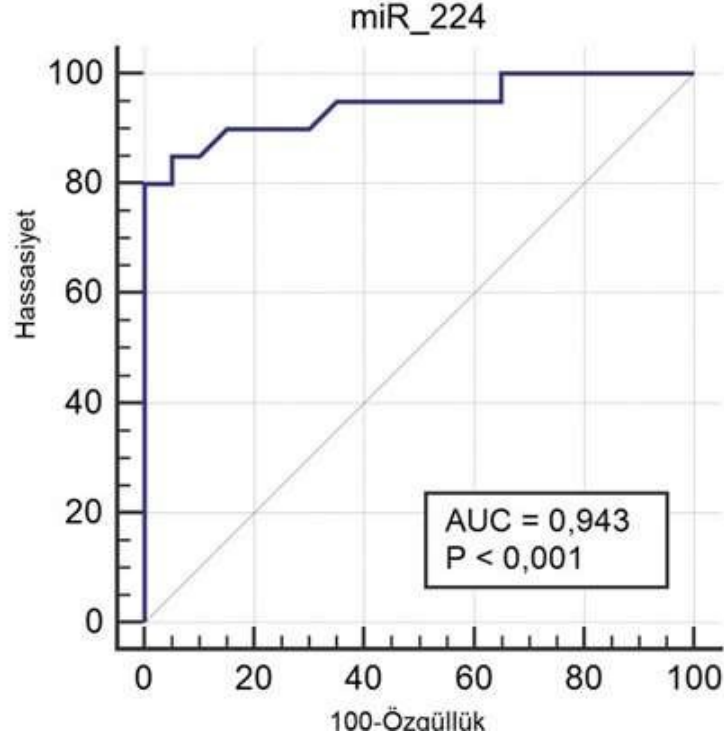


Şekil 4.12: miR-221 ROC analizi. Kontrol grubu (20 serum örneği), Grup 2 (20 serum örneği), AUC: 0.679; %95 CI: 0.51-0.81 ve P:0.047.

miR-221 için ROC analiz değerlerinin hassasiyet ve özgüllük için yeterli olmadığı kontrol ve grup 2 deney verileri için yanlış pozitif ve yanlış negatifliklerin fazla olduğu sonucu çıkmaktadır. Elde edilen miR-221 ROC eğrisinin eşik çizgisi ile kesişmesi ve birlikte gerçekleştirilen $-\Delta\Delta C_t$ analizleri de göz önünde bulundurulduğunda kontrol ve grup 2 verilerinin çok yakın olmaları bu testin diagnostik olarak kullanımının uygun olmadığını göstermektedir.

4.2.3.5. MiR-224 için Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri

MiRNA-224 için kontrol ve grup 2 (HBV+, HCC+ /Serum) örneklerinin referans gen ile ekspresyon farklılığına göre oluşturulan özgüllük ve hassasiyet analizleri Bölüm 3.9’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir ve veriler Şekil 4.13’de yer almaktadır.

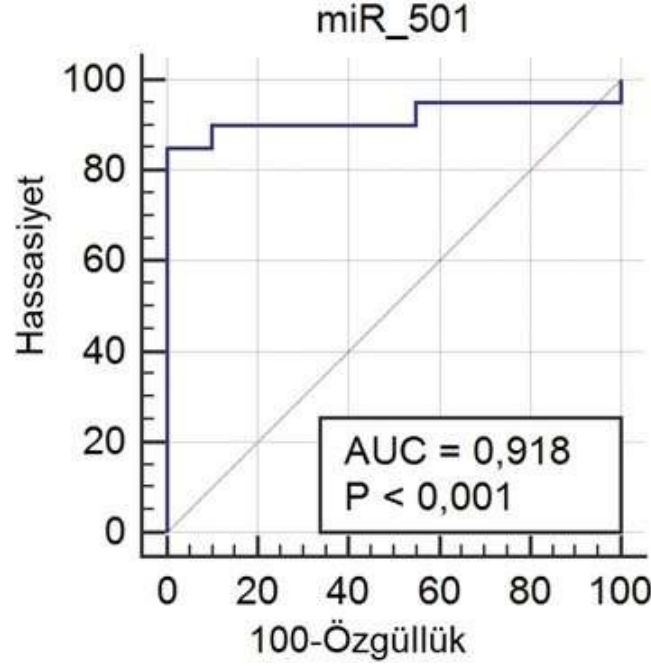


Şekil 4.13: miR-224 ROC analizi. Kontrol grubu (20 serum örneği), Grup 2 (20 serum örneği), AUC: 0.943; %95 CI: 0.82-0.99 ve $P < 0.001$.

MiR-224 için kontrol grubu ile deney grupları arasındaki ekspresyon farklılığı Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Bu ekspresyon farklılığı grup 1 ve grup 2 arasında da istatikselsel olarak anlamlıdır. Bu nedenle miR-224 özellikle HBV ile ilişkili akut süreçlerde değerlendirilmesi için ROC analizleri eğrinin eşik çizgisinden uzak olması sebebiyle diagnostik kullanım için uygun olduğu göstermektedir.

4.2.3.6. MiR-501 için Özgüllük ve Hassasiyet Analizleri

MiRNA-501 için kontrol ve grup 2 (HBV+,HCC+ /Serum) örneklerinin referans gen ile ekspresyon farklılığına göre oluşturulan özgüllük ve hassasiyet analizleri Bölüm 3.9’da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir ve veriler Şekil 4.14’de yer almaktadır.



Şekil 4.14: miR-501 ROC analizi. Kontrol grubu (20 serum örneği), Grup 2 (20 serum örneği), AUC: 0.918; %95 CI: 0.78-0.98 ve $P < 0.001$.

MiR-501 için kontrol örnekleri ile grup 1 ve grup 2 arasında ekspresyonlarda artma istatistiksel olarak anlamlılığı Şekil.4.10’da gösterilmiştir. Bu miRNA için kontrol ve deney grupları arasındaki ekspresyon farklılığı çok fazla olduğundan ROC eğrisinin eşik çizgisinden uzaktadır. Bu da bu miR-501’in diagnostik olarak kullanımının uygun olabileceği yorumuna neden olmaktadır. Fakat $-\Delta\Delta C_t$ analizleri göz önünde bulundurulduğunda bu parametre grup 1 ve grup 2 arasında anlamlı bir farklılık göstermemektedir.

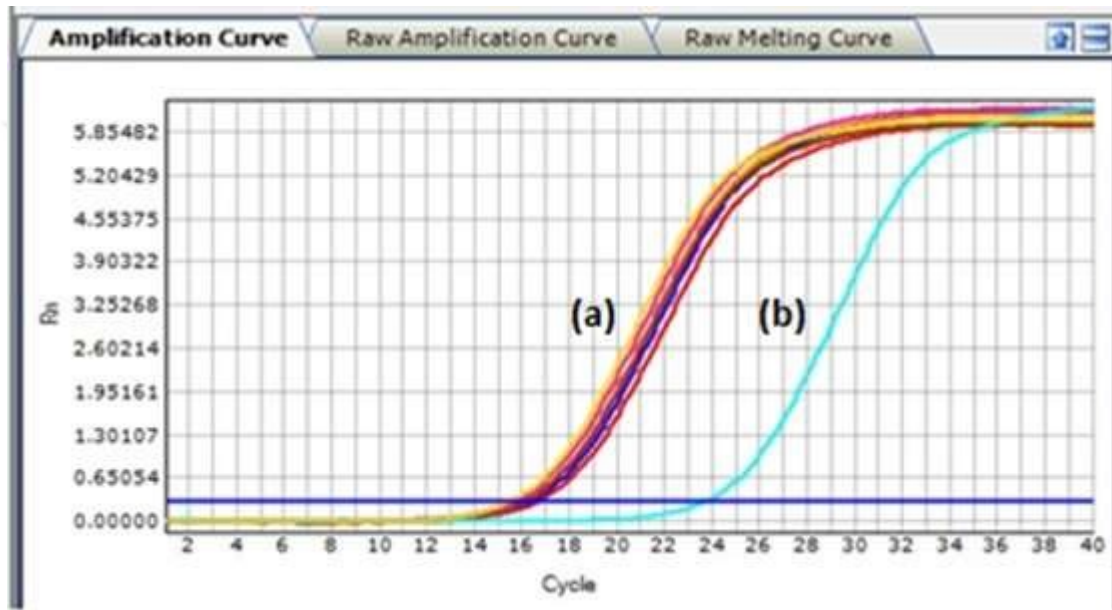
4.2.3. MiRNA İç Kontrolü GZ-PZR Sonuçları (İnternal Kontrol)

MiRNA izolasyonu öncesi doku ve serum örneklerine Ath-miR-168a eklenmiş ve izolasyon performansı buna göre analiz edilmiştir (Bölüm 3.7.2.). İç kontrolü olarak elde edilen veriler Tablo 4.3’te yer almaktadır.

Tablo 4.4: İnhibisyon kontrolün kontrol ve deney grupları arasındaki Ct varyasyon verileri.

	Kontrol (HBV-HCC -/Serum)	Grup 1 (HBV+ HCC-/Serum)	Grup 2 (HBV+ HCC+/Serum)	Grup 3 (HBV+ HCC+/ Doku)
Ath-168a	17,00±1,25 Ct	17,43±1,40 Ct	16,79±0,85 Ct	17,14±0,35 Ct

Yapılan inhibisyon kontrolü çalışmasında elde edilen veriler Şekil 4.15’de yer almaktadır.



Şekil 4.15: (a) inhibisyon kontrolü olarak kullanılan ath-168a gerçek zamanlı PZR logoritmik artışı, (b) bir örnekte meydana gelen inhibisyon artışı.

Şekil 4.15’de gösterilen geç amplifikasyonlar (b) inhibisyon olarak değerlendirilip deney tekrarları gerçekleştirildi. Deney tekrarlarında aynı şekilde inhibisyon gerçekleşen örnekler tekrar izolasyon işlemlerinden geçirildi ve ath-168a miRNA çalışması tekrar edildi. Tekrarlarında uygun çıkan örnekler miRNA’lar için çalışmaya dahil edildi.

4.2.4. MiRNA Normalizasyonu GZ-PZR Analizleri

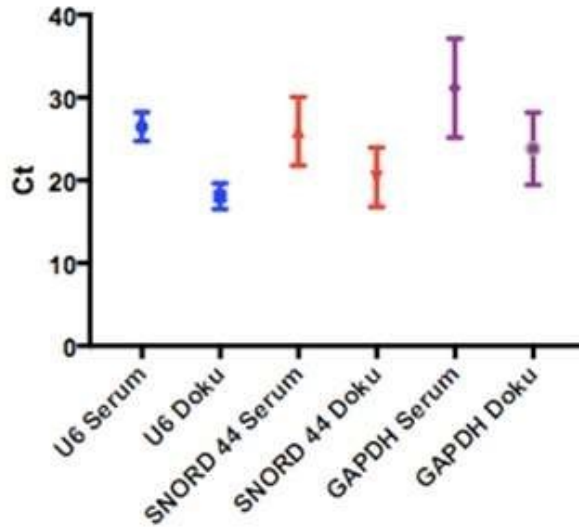
İzolasyonlar sonrası çalışılan kontrol ve deney gruplarından gerçek zamanlı PZR analizleri için Bölüm 3.5.1.’de anlatıldığı şekilde normalizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler 2 farklı mikroRNA (SNORDD44 ve U6 snRNA) ve 1 mRNA (GAPDH) için gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen verilerin varyasyonu Tablo 4.4’de yer almaktadır. GAPDH mRNA için çoğaltılan ampikonun boyutu 452 baz çifti uzunluğundadır.

Tablo 4.5: Normalizasyon için kullanılan 2 farklı miRNA (U6 snRNA, SNORDD44) ve 1 mRNA’nın (GAPDH) Ct varyasyon verileri.

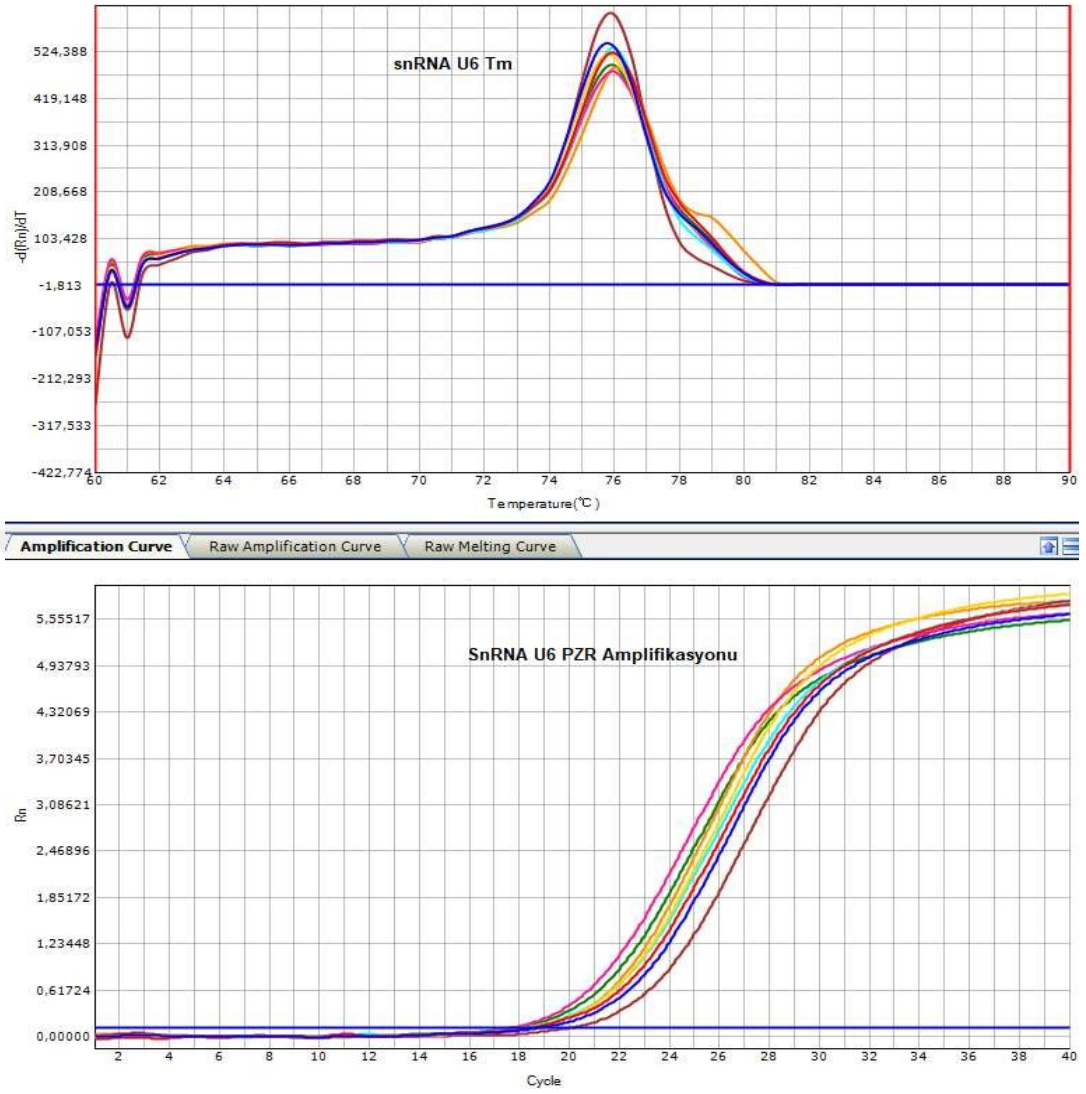
	Ct Varyasyonu	
	Serum (Ct/Standart Sapma)	Doku (Ct/Standart Sapma)
U6 snRNA	26.49 ± 1,75	18.1 ± 1,54
SNORDD 44	25.94 ± 4,13	20,41 ± 1,13
GAPDH	31.18 ± 5,98	23,83 ± 4,36

Ayrıca elde edilen verilerin analizleri ve Şekil 4.16’da yer almaktadır.



Şekil 4.16: Normalizasyonda kullanılan 2 snRNA ve 1 mRNA’nın Ct analizi.

Elde edilen veriler ışığında U6 snRNA’nın normalizasyon için daha uygun olduğu kontrol grubun ve deney grubundan seçilen toplamda 20 serum ve deney grubu 3’teki 20 doku örneği ile de ayrıca çalışılmıştır, elde edilen veriler Şekil. 4.17’de yer almaktadır.

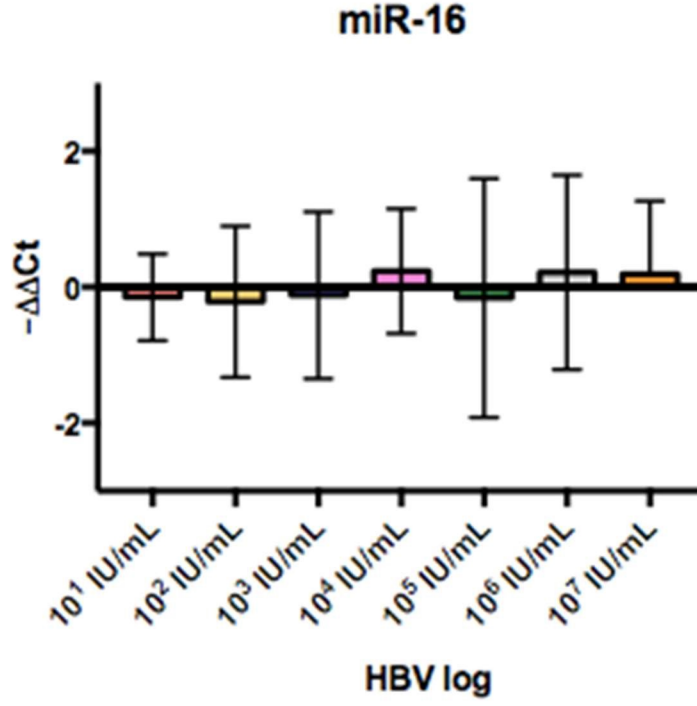


Şekil 4.17: snRNA U6 amplifikasyonu ve erime eğrisi analizleri.

4.2.4. HBV DNA ile MiRNA - $\Delta\Delta Ct$ Korelasyon Analizleri

4.2.4.1. HBV DNA ile MiR-16 - $\Delta\Delta Ct$ Korelasyon Analizleri

MiRNA-16'nın - $\Delta\Delta Ct$ analizleri ile HBV DNA logaritmik analizleri Şekil 4.18'de yer almaktadır.

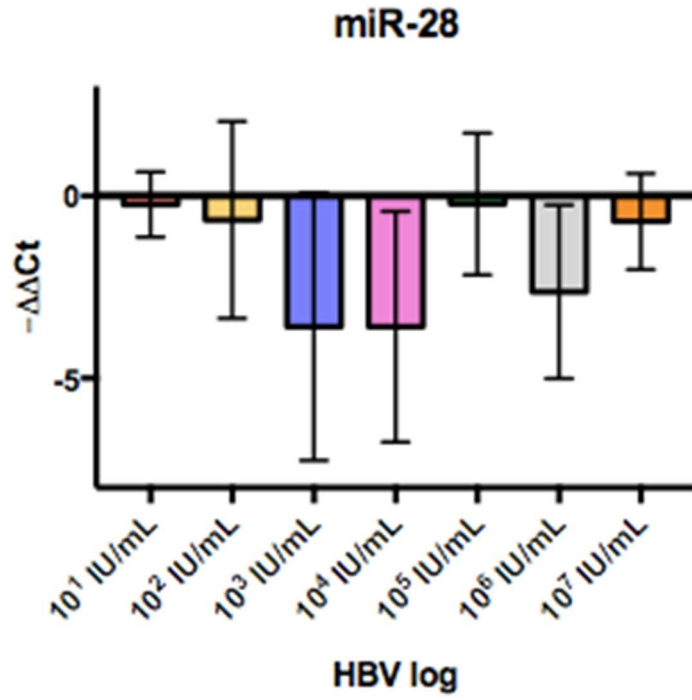


Şekil 4.18: miR-16 HBV DNA kantitasyon analizleri.

MiR-16 ile HBV DNA kantitasyonları arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır.

4.2.4.2. HBV DNA ile MiR-28 - $\Delta\Delta Ct$ Korelasyon Analizleri

MiR-28'in - $\Delta\Delta Ct$ analizleri ile HBV DNA logaritmik analizleri Şekil 4.19'da yer almaktadır.

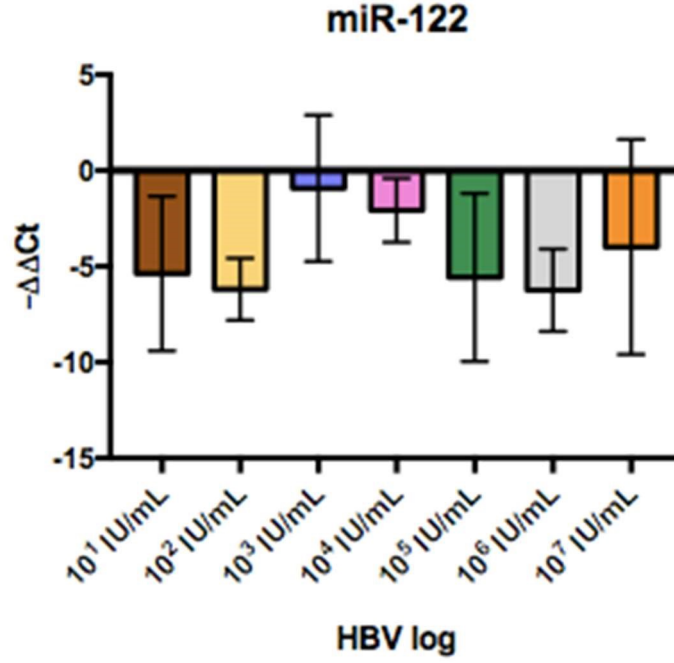


Şekil 4.19: miR-28 HBV DNA kantitasyon analizleri.

MiR-28'in ekspresyonunda 10^1 , 10^2 , 10^3 ve 10^4 arasında HBV DNA titresi ile uyumlu bir azalış olsa da standart sapmalarının çok fazla olması ve daha yüksek kantitasyon değerlerinde (10^5 , 10^6 , 10^7) bir korelasyon saptanmamıştır.

4.2.4.3. HBV DNA ile MiR-122 - $\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri

MiRNA-122'nin - $\Delta\Delta CT$ analizleri ile HBV DNA logaritmik analizleri Şekil 4.20'de yer almaktadır.

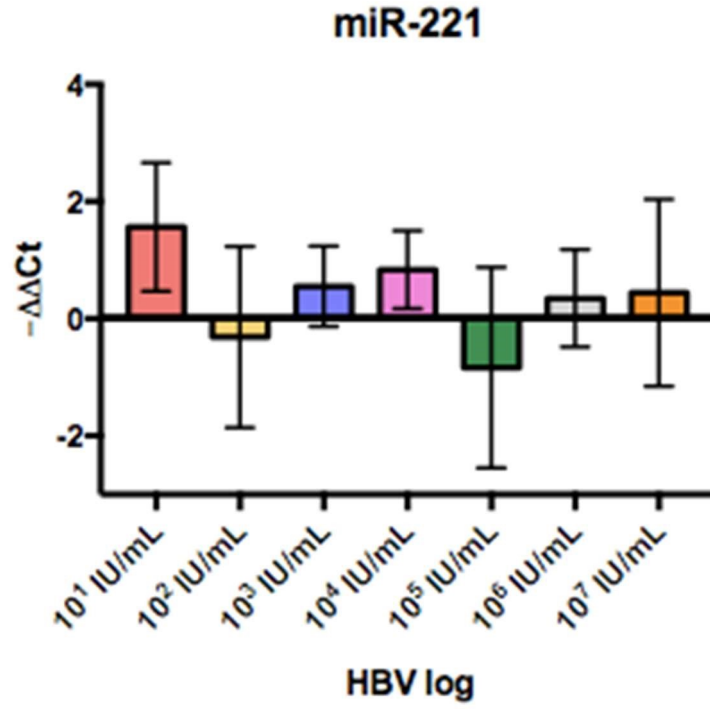


Şekil 4.20: miR-122 HBV DNA kantitasyon analizleri.

MiR-122 ile HBV DNA kantitasyonları arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır.

4.2.4.4. HBV DNA ile MiR-221 - $\Delta\Delta Ct$ Korelasyon Analizleri

MiR-221'in - $\Delta\Delta Ct$ analizleri ile HBV DNA logaritmik analizleri Şekil 4.21'de yer almaktadır.

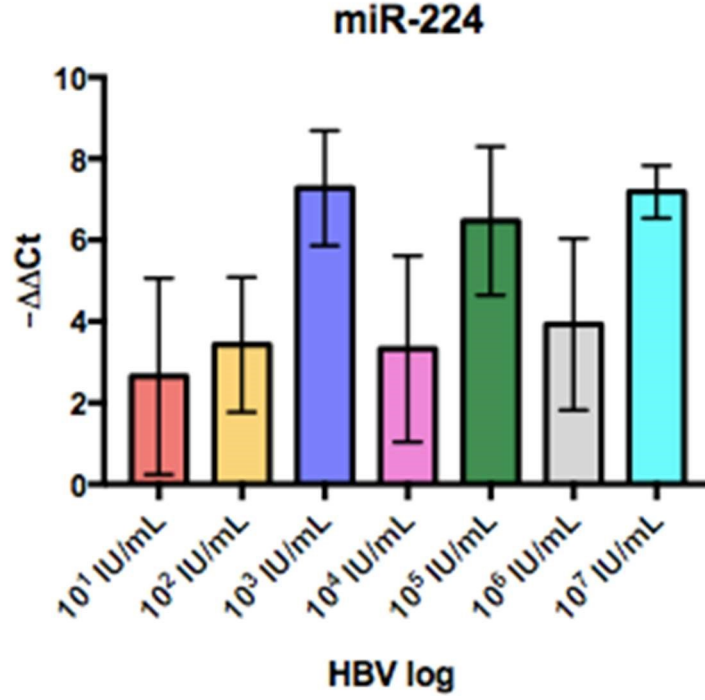


Şekil 4.21: miR-221 HBV DNA kantitasyon analizleri.

MiR-221 ile HBV DNA kantitasyonları arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır.

4.2.4.5. HBV DNA ile MiR-224 - $\Delta\Delta Ct$ Korelasyon Analizleri

MiR-224'ün - $\Delta\Delta Ct$ analizleri ile HBV DNA logaritmik analizleri Şekil 4.22'de yer almaktadır.

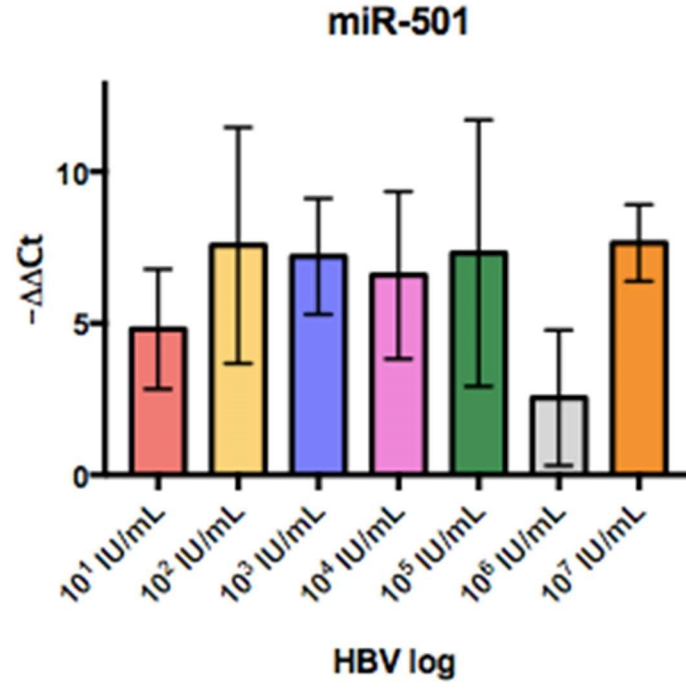


Şekil 4.22: miR-224 HBV DNA kantitasyon analizleri.

MiR-224'ün ekspresyonunda 10^1 , 10^2 , 10^3 arasında HBV DNA titresi ile uyumlu bir artış olsa da standart sapmalarının çok fazla olması ve daha yüksek kantitasyon değerlerinde (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7) bir korelasyon saptanmamıştır.

4.2.4.6. HBV DNA ile MiR-501 - $\Delta\Delta\text{CT}$ Korelasyon Analizleri

MiRNA-501'in - $\Delta\Delta\text{CT}$ analizleri ile HBV DNA logaritmik analizleri Şekil 4.23'de yer almaktadır.



Şekil 4.23: miR-501 HBV DNA kantitasyon analizleri.

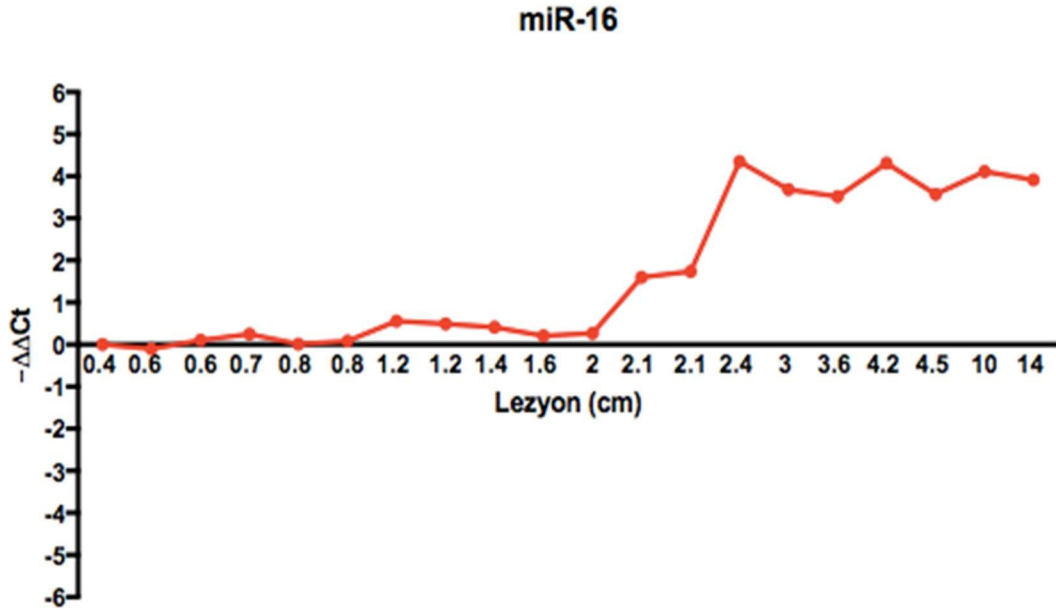
miR-501 ile HBV DNA kantitasyonları arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır.

4.2.5. Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA - $\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri

Ayrıca gerçekleştirilen çalışmalarda doku lezyon boyutları ile miRNA - $\Delta\Delta CT$ korelasyon analizleri 6 miRNA için çalışılmıştır.

4.2.5.1. Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-16 - $\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri

MiRNA-16'nın - $\Delta\Delta CT$ analizleri ile biyopsi materyallerinin lezyon boyutlarının analizleri Şekil 4.24'de yer almaktadır.

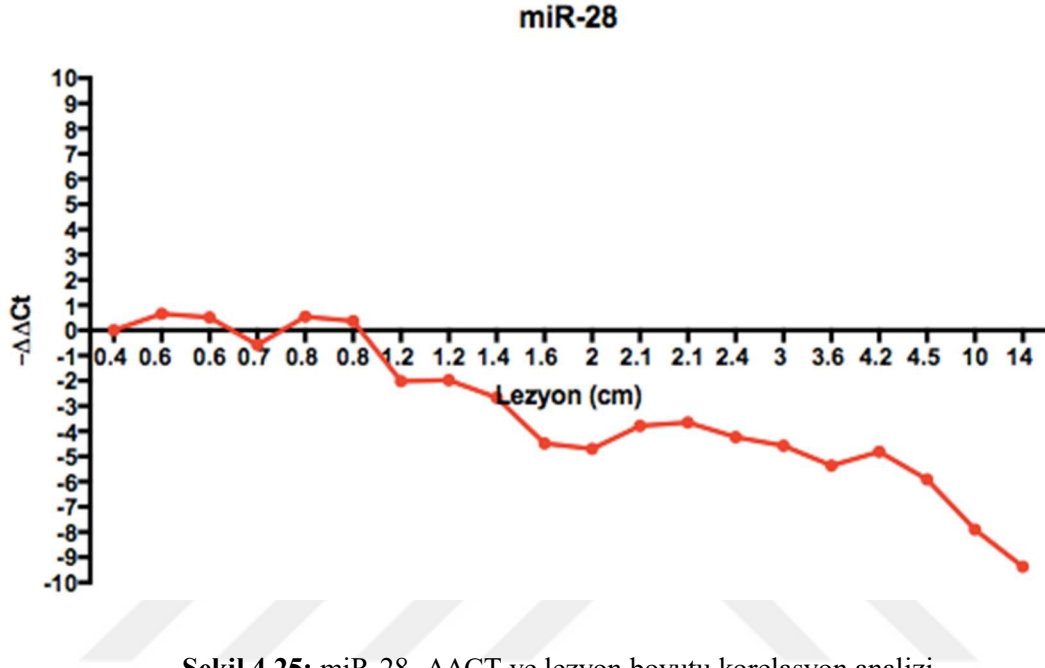


Şekil 4.24: miR-16 - $\Delta\Delta CT$ ve lezyon boyutu korelasyon analizi.

Lezyon büyüklüğünün 2-2.4 cm aralığında miR-16 ekspresyonunda yaklaşık 4.5 kat değişim gösterdiği sonrasında da miR-16 ekspresyonun değişmediği gösterilmiştir.

4.2.5.2. Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-28 - $\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri

MiRNA-28'in - $\Delta\Delta CT$ analizleri ile biyopsi materyallerinin lezyon boyutlarının analizleri Şekil 4.25'de yer almaktadır.

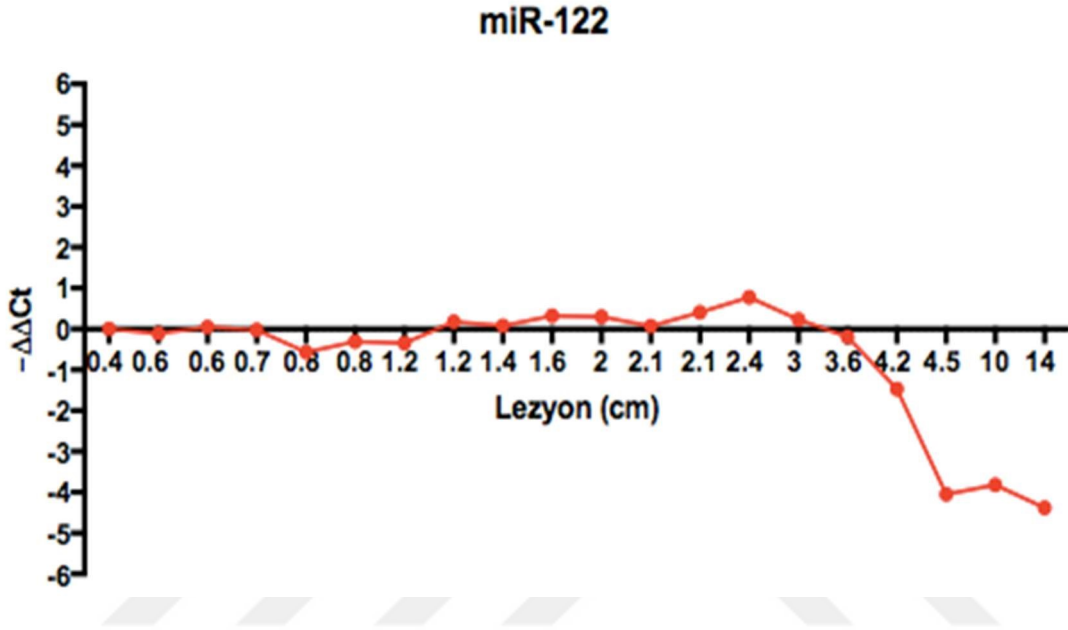


Şekil 4.25: miR-28 - $\Delta\Delta CT$ ve lezyon boyutu korelasyon analizi.

Lezyon büyüklüğünün 0.8 cm'den sonra miR-28 ekspresyonunun sürekli azaldığı, 0.8-2 cm arasında miR-28 ekspresyonunun yaklaşık 5 kat değiştiği gösterilmiştir.

4.2.5.3. Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-122 - $\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri

MiRNA-122'nin - $\Delta\Delta CT$ analizleri ile biyopsi materyallerinin lezyon boyutlarının analizleri Şekil 4.26'da yer almaktadır.

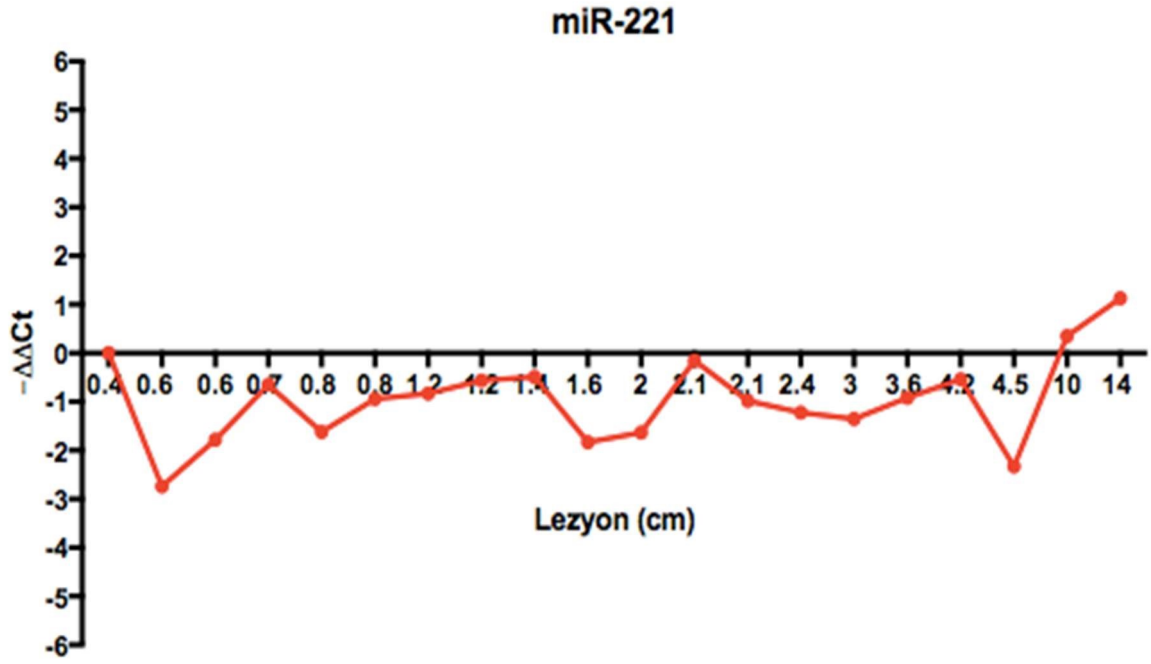


Şekil 4.26: miR-122 - $\Delta\Delta CT$ ve lezyon boyutu korelasyon analizi.

Lezyon büyüklüğünün 3.6-4.5 cm arasında miR-122 ekspresyonunun yaklaşık 5 kat azaldığı gösterilmiştir.

4.2.5.4. Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-221 $-\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri

MiRNA-221'in $-\Delta\Delta CT$ analizleri ile biyopsi materyallerinin lezyon boyutlarının analizleri Şekil 4.27'de yer almaktadır.

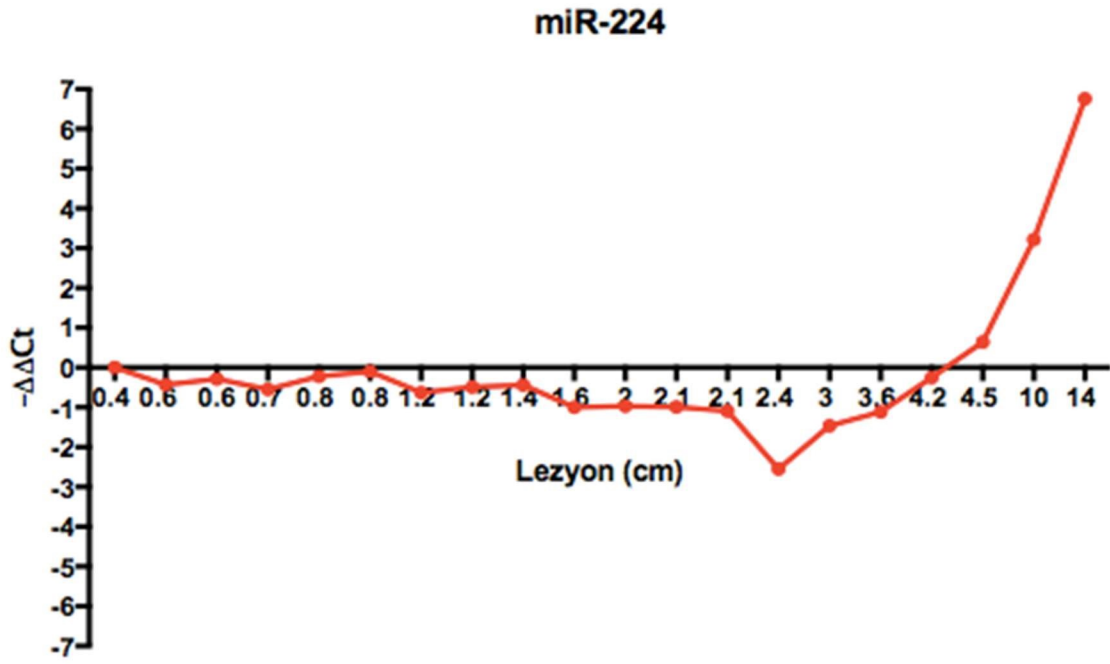


Şekil 4.27: miR-221 $-\Delta\Delta CT$ ve lezyon boyutu korelasyon analizi.

Lezyon büyüklüğü ile miR-221 ekspresyonu arasında herhangi bir farklılık analiz edilmemiştir.

4.2.5.5. Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-224 - $\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri

MiRNA-224'ün - $\Delta\Delta CT$ analizleri ile biyopsi materyallerinin lezyon boyutlarının analizleri Şekil 4.28'de yer almaktadır.

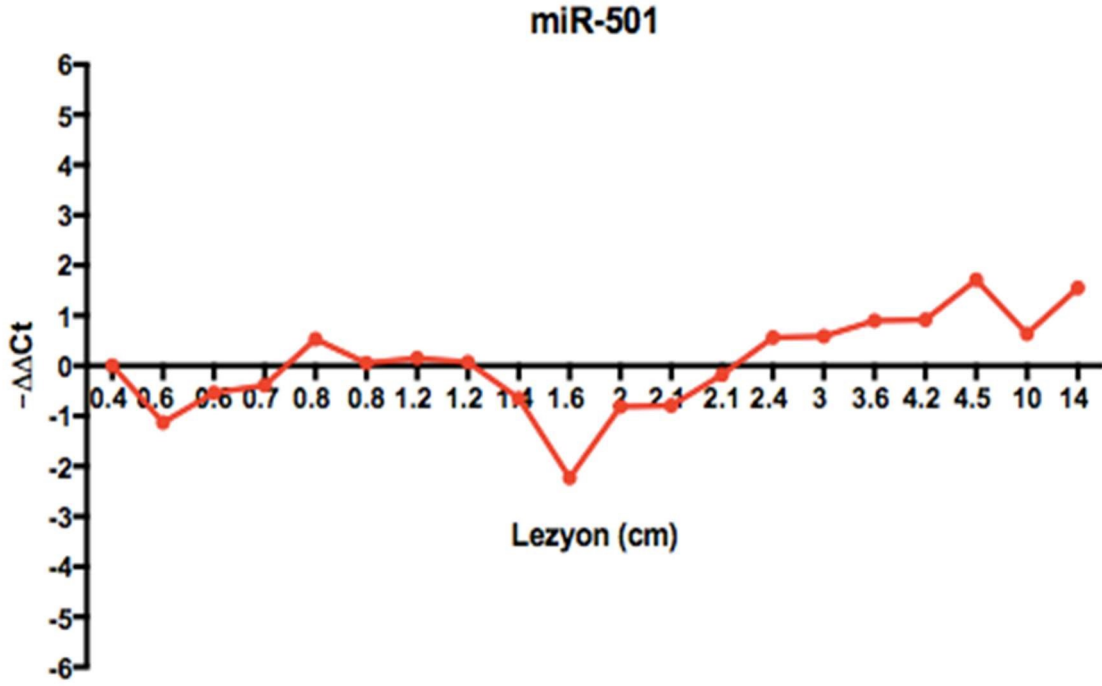


Şekil 4.28: miR-224 - $\Delta\Delta CT$ ve lezyon boyutu korelasyon analizi.

Lezyon büyüklüğünün 0.4-4.2 cm arasında miR-224 için ekspresyonunun fazla değişmediği fakat 4.2 cm sonrasında artış gösterdiği analiz edilmiştir.

4.2.5.6. Biyopsi Materyali Lezyon Boyutu ve MiRNA-501 - $\Delta\Delta CT$ Korelasyon Analizleri

MiRNA-501'in - $\Delta\Delta CT$ analizleri ile biyopsi materyallerinin lezyon boyutlarının analizleri Şekil 4.29'de yer almaktadır.



Şekil 4.29: miR-501 - $\Delta\Delta CT$ ve lezyon boyutu korelasyon analizi.

Lezyon büyüklüğü ile miR-501 ekspresyonu arasında herhangi bir farklılık analiz edilmemiştir.

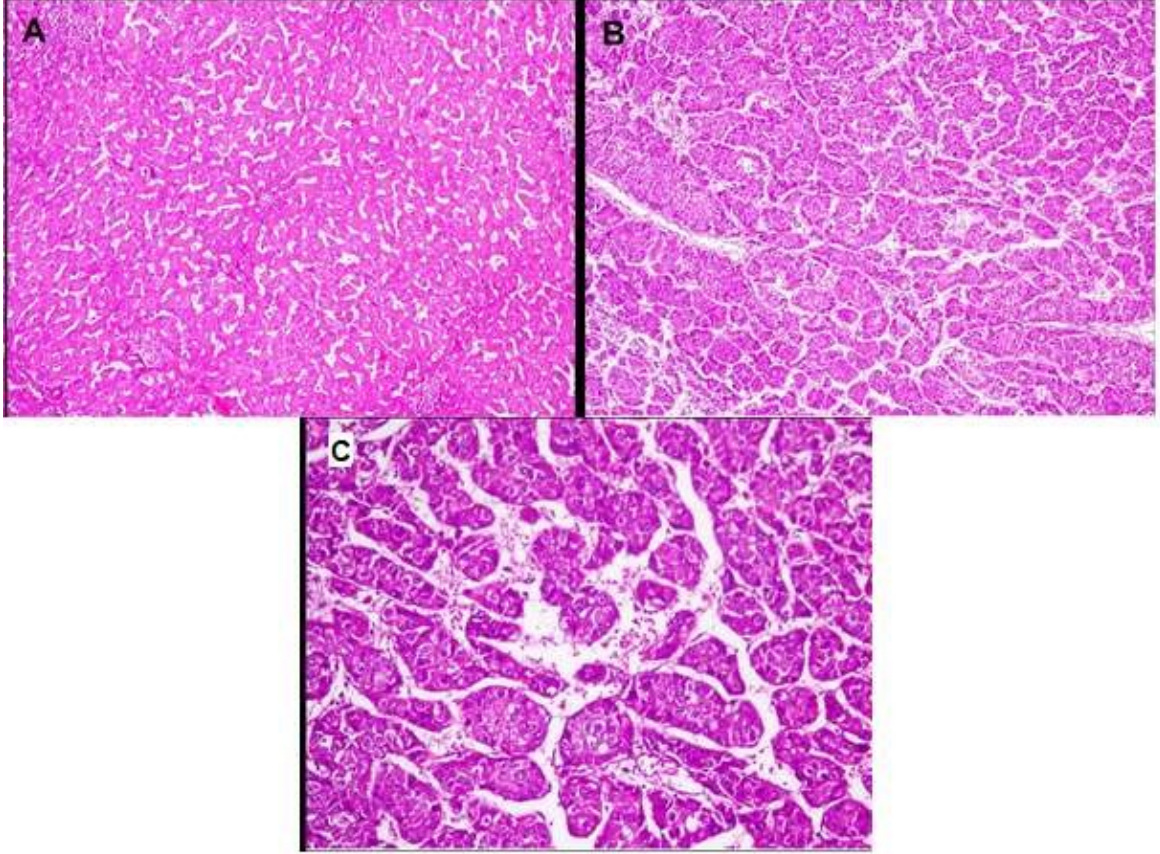
Ayrıca doku lezyon boyutları ile 6 miRNA için - $\Delta\Delta Ct$ analizleri Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.6: Tüm miRNA'lar için lezyon boyutları ile $-\Delta\Delta C_t$ verileri.

Lezyon Boyutu (cm)	miR-16	miR-28	miR-122	miR-221	miR-224	miR-501
0.4	0	0	0	0	0	0
0.6	-0,1	0,66	-0,11	-2,74	-0,43	-1,13
0.6	0,1	0,51	0,05	-1,78	-0,29	-0,54
0.7	0,25	-0,57	-0,02	-0,65	-0,55	-0,39
0.8	0,01	0,54	-0,57	-1,62	-0,22	0,53
0.8	0,08	0,37	-0,31	-0,94	-0,1	0,05
1.2	0,56	-2,02	-0,35	-0,83	-0,63	0,15
1.2	0,49	-1,97	0,18	-0,56	-0,49	0,07
1.4	0,41	-2,67	0,08	-0,49	-0,44	-0,65
1.6	0,21	-4,48	0,32	-1,83	-1	-2,23
2.0	0,27	-4,7	0,3	-1,63	-0,97	-0,81
2.1	1,6	-3,79	0,07	-0,15	-0,99	-0,79
2.1	1,74	-3,65	0,41	-0,98	-1,09	-0,18
2.4	4,35	-4,23	0,78	-1,22	-2,55	0,56
3.0	3,68	-4,57	0,23	-1,35	-1,46	0,59
3.6	3,52	-5,36	-0,19	-0,92	-1,11	0,9
4.2	4,31	-4,81	-1,47	-0,54	-0,25	0,92
4.5	3,57	-5,91	-4,05	-2,33	0,64	1,71
10	4,11	-7,9	-3,82	0,35	3,22	0,64
14	3,91	-9,37	-4,38	1,13	6,76	1,55

4.3. PATOLOJİK İNCELEMELER

Elde edilen protokol ışığında hematoksin ve eozin boyama görüntüleri Şekil 4.30’da gösterilmiştir.



Şekil 4.30: Patoloji örneklerinin hematoksin ve eozin boyama görüntüleri A) Normal karaciğer dokusu x 100 büyütme, B) HSK dokusu x 100 büyütme, C) HSK dokusu x 400 büyütme.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer kanserlerinde en kritik nokta hastalığın erken teşhisidir. HSK'nın erken tanısı sayesinde hastalık ile çok daha agresif şekilde mücadele etmek olası olacaktır. Bu hastalık ile ilgili etkin bir tarama programının oluşturulması için ilk aşamalardan bir tanesi yüksek hassasiyete sahip kabul edilebilir ve uygulanabilir test veya testlerin var olmasından geçer. HSK'nın başarılı bir şekilde izlenmesinin anahtarı yüksek riskli hasta grubunu tanımlayarak gerçekleşir. Kanser teşhisi için kan testleri (tümör marker alfa-fetoprotein (AFP), radyografik görüntüleme uygulamaları (ultrason, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme) ve karaciğer biyopsi örnekleri ile tanı mümkündür.

AFP, 40 yıldan daha uzun süredir preklinik HSK'yı saptamak için kullanılan bir tümör markırı olarak tanımlanmış serum glikoproteinidir. Fetal dönem haricinde serumda meydana gelen AFP yükselmeleri malignant bir patoloji ile ilişkilendirilebilir (Kashyap ve diğ., 2001). Hepatik divertikül ile aynı endodermal kökenden türevlenen herhangi bir tümör (mide, pankreas ve safra kanalları) de serumda AFP seviyelerinde artışa neden olmaktadır. Yine kronik hepatit (% 20) ve siroz hastalarında (% 40) AFP seviyesi yüksektir (Johnson, 2001). AFP seviyesi hepatoblastomlu hastaların yaklaşık % 90'ında HSK'lı hastaların ise % 50'sinde artış göstermekte olsa da AFP değerinin yükselmesi akla sadece HSK'yı getirmez. Yine AFP seviyesi yüksekliği infantil hemanjiom, mezenşimal hamartom gibi iyi huylu, yolk-sak tümörleri ve sarkomlar gibi kötü huylu tümörler ile de ilgili olabilir. Tüm bunlara ek olarak HSK tanısı konulmuş bireylerin bazılarında da hiç AFP yüksekliği saptanmadığı da unutulmamalıdır (Wang ve diğ., 2012). Ayrıca AFP'nin tümör boyutu ile orantılı olduğu da gösterilmiştir. Tayland'da yapılan bir çalışmada AFP'nin 400 ng/mL olan HSK hastalarında bilobar tutulum, portal ven trombozu ve sağ kalımda azalma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Tangkijvanich ve diğ., 2000). Hastalık tedavi edilmediğinde AFP üreten tümörlerin zaman içerisinde AFP üretimine devam ederek artırdıkları bilinmektedir. Buna ek olarak zayıf farklılaşma gösteren tümör hücrelerinin çok daha agresif olup çok daha yüksek AFP seviyelerine sahip olduğu da gösterilmiştir (Hanazaki ve diğ., 2001). Fakat HSK tanısı konulmuş hastaların yaklaşık % 30'unda AFP seviyeleri normaldir ve ilerlemiş HSK'da dahi bir artış göstermez (Johnson, 2001). Ayrıca AFP ile ilgili yapılan bir çalışmada özgünlüğünün % 100'e yakın olduğu durumlarda hassasiyeti % 45 (Gupta ve diğ., 2003), hassasiyetinin % 78,9 yükseldiği bir başka çalışmada ise özgünlüğü % 78,1 olduğu rapor edilmiştir (Taketa,

1990). Yine biyokimyasal olarak kullanılan markırlardan bir tanesi de des-gamma-karboksi protrombin'dir (DCP). HSK'da protrombinin bu normal olmayan formuna yüksek oranda rastlanır (Howard ve diğ., 1978). Özellikle 3 cm'den küçük lezyonlarda düşük sensivite gösterdiği ortaya konmuştur (Weitz ve Liebman, 1993; Marrero ve diğ., 2003). Anormal laboratuvar değerleri kronik karaciğer hastalığı için spesifik değildir ve spironolakton gibi sirozlar için yaygın olarak reçete edilen ilaçların etkilerini yansıtabilir (Moore ve Aithal, 2006).

Ultrason görüntülemeleri genellikle 3 cm'den küçük hepatik tümörlerde tespit edilmesi için AFP'ye ek olarak veya AFP yerine kullanılır. Ultrasonun yüksek kullanılabilirliği, düşük maliyeti ve AFP ile kombinlendiğinde % 94'e kadar yüksek tanı sağlayabilmesi yöntemin avantajıdır (Sherman ve diğ., 1995). Ayrıca son yıllarda ultrason tekniğine eklenen arter içi karbon dioksit ve helyum gibi kontrast ajanlar doğruluğu artırmakla birlikte, genel olarak sirozlu bireylerde ve obezlerde ayrıca bir operatör deneyimi gerektirmesi dezavantajıdır, sirozlu hastalarda hassasiyet ve pozitif prediktif değeri % 15'e kadar düşebilmektedir (Pateron ve diğ., 1994; Murakami ve diğ., 2001; Choi ve diğ., 2002). Sonografik varyasyonlar özellikle yağ, kalsiyum ve nekroz varlığında görülmektedir. Bilgisayarlı tomografi (BT) ise sürveyans testi olarak daha iyi çalışılmıştır ve daha ileri tanı amaçlı olarak daha sık kullanılır. Arteriyel faz gelişimi HSK tespitini % 10 oranında artırmaktadır (Oliver ve diğ., 1996). Yapılan bir çalışma BT'nin ultrason veya AFP'ye oranla tek başına daha yüksek bir duyarlılığa (% 88) sahip olduğunu göstermiştir (Chalasani ve diğ., 1999). BT'nin yüksek maliyeti, daha az kullanılabilir olması yöntemin dezavantajıdır. İntravenöz yoldan kontrast madde verilerek gerçekleştirilen BT sonrası eğer gerekli görülürse hemanjiomu belirlemek ve olası cerrahi operasyon için damarsal anatomiye ortaya koymak için Manyetik Rezonans (MR)'da HSK'nın tespitinde kullanılan bir diğer görüntüleme sistemidir (Choi ve diğ., 2014). Brancatelli ve arkadaşları bilgisayarlı tomografi (BT) görüntüleme sistemlerinde rejenere nodüllerin, hemanjiomların, fokal yağların, displastik nodüller ve peliosisler gibi hepatik lezyonların HSK'ya çok benzerlik gösterebileceğini rapor etmiştir (Brancatelli ve diğ., 2003). BT sistemlerine dahil edilen bir modül sayesinde (multidedektör) kontrast maddenin çok daha hızlı analizlenmesine olanak vererek daha yüksek kalite, ince bölgelerin görüntülenmesi ve üç boyutlu görüntüleme yapabilecek şekilde sistemler modifiye edilse dahi (MDBT) yüksek maliyetleri nedeniyle kullanımları sınırlıdır. Oliver ve arkadaşları yeni geliştirilen bu MDBT sistemlerinin klasik BT yöntemlerine göre HSK teşhisini % 66 artırdığını rapor etmiştir (Lee ve diğ., 2004). Görüntüleme sistemleri ile HSK sıklıkla siroz ve sekonder malignitelerden ayırt edilememesi

nedeniyle zorluk oluşturmaktadır. MR hassasiyeti özellikle çapı 2 cm'den daha düşük olan tümörlerin değerlendirilmesinde hassasiyeti çok düşük kalmaktadır (Krinsky ve diğ., 2001). Gadolinyum içeren kontras madde ile gerçekleştirilen uygulamalar HSK'nın erken fazı ile karakterize olan arter kan akışını ayırt edemez ve bu şekilde bilgisayarlı tomografiye göre çok avantaj içermez. Fakat süper paramanyetik demir oksit doku spesifik olarak karaciğerdeki Kupffer hücrelerine özgüdür, ayrıca iyi huylu oluşumlar yerine kötü huylu tümörlere bağlanan bu partiküller ile gadolinyum içeren kontrast maddeli MR'ın kombine edildiklerinde HSK için ayırım gücü çok daha yüksek bir araç haline gelir (Niendorf ve diğ., 2015). Tüm bu uygulamalar sağlık merkezlerinde farklı popülasyonlarda ve imkanlar ölçüsünde teşhis amacıyla kullanılmakla birlikte karaciğer kanseri için görüntüleme sistemleri için bir tanı prosedürü ve kılavuz bulunmamaktadır.

Yapılan teşhislerde biyokimyasal karaciğer enzimi analizleri sadece karaciğer kanseri teşhisinde değil birçok rahatsızlıkta kandaki değerleri değişmektedir, bu da bu testlerin tanı için değil tarama için uygunluklarını göstermektedir. Ayrıca karaciğer enzimi testleri hastada olması muhtemel tümör boyutu ve evresi ile ilgili bir veri sunmaz. Bir sonraki adım olan görüntüleme testleri ise maliyetleri, uygulama kısıtlamaları ve bazı ilaçlı uygulamaların bazı hasta grupları üzerinde olumsuz etkileri gibi dezavantajlara sahiptir. Ayrıca mevcut sağlık sistemi üzerinde hiçbir zaman tarama testi rahatlığı oluşturmaması da bir diğer handikaptır. Bu aşamaların en sonunda ise kesin tanı için kritik öneme sahip olan karaciğer biyopsi örneklerinin patolojik olarak değerlendirilmeleridir. Bu sayede hem lezyon boyutu hem de karaciğer tümörünün derecesi belirlenmiş olmaktadır.

Karaciğer biyopsisi ile şüpheli lezyonların değerlendirilmesi ile HSK'nın kesin tanısı konulabilmektedir. BT ve ultrason eşliğinde ince iğne aspirasyonu ve iğne biyopsi ile sitolojik ve histolojik örnekler alınabilir. Bu 2 yöntemin birlikte kullanılması tek tek kullanılmalarına oranla tanısal doğruluğu daha yüksektir. Bu yöntemlerin duyarlılıkları ve özgüllükleri % 96'ya varabilmektedir (Borzio ve diğ., 1994). Karaciğer biyopsisinin klinik, laboratuvar ve radyografik değerlendirmeden sonra yapılmasına gerek yoktur. Karaciğer biyopsisi ile 2 cm'den daha küçük çaptaki tümörler dahi yüksek duyarlılık ile (% 95,6) saptanabilir (Caturelli ve diğ., 2004). Karaciğer biyopsisi plateletlerin 50.000 mm³'ten fazla olduğu ve INR (pıhtılaşma süresi)'nin 2'den büyük olduğu durumlarda uygulanmaz. Ayrıca tümörün biyopsi iğnesi izinde yayılma potansiyeli de yine risk faktörleri arasındadır (Durand ve diğ., 2001; Kim

ve diğ., 2000). Ayrıca yöntemin invaziv olması ve değerlendirme zorluğu da yine önemli negatif noktalarıdır.

MiRNA'lar farklı malignant tümörler içeren hastaların doku ve serumlarında farklı ekspresyon sergilerler, bu farklılığın sebebi birçok hücrel fonksiyonun regülasyonu ve gen iletişim ağı olmasıdır. miRNA'ların az sayıda olanlarının dahi tespiti gelişimsel bilgi ve tümörlerin farklılaşma derecelerinde çok sayıda mRNA'dan daha fazla bilgi sağlar. MiRNA'lar ayrıca hastalığın seyrinin öngörülmesi için prognostik biyobelirteç olarak kullanılabilirler. Ayrıca kansere ek olarak viral enfeksiyonlarda, sinir sistemi düzensizliklerinde, kardiyovasküler bozukluklarda, kas hastalıklarında, diyabet ve diğer hastalıklarda miRNA'ların ekspresyonlarının değiştiği de bir gerçektir. Bu veriler ışığında da miRNA'ların kullanılması teşhis stratejisi olarak ortaya çıkmaktadır. Birçok insan miRNA'sı, kanser ile ilişkili genomik bölgelerde (TARBP2, AGO2, Dicer ve Exportin-5) veya kırılgen bölgelerde bulunur ve hücre çoğalması, hücre yapışması, apoptoz ve anjiyogenez gibi önemli işlemleri kontrol eder; kanserin başlangıcında, ilerlemesinde ve metastazında önemli roller oynar (Segura ve diğ., 2015; Wang ve diğ., 2016)

MiRNA'lar hedeflerine ve hücrel içeriğe göre hem onkogen hem de tümör baskılayıcı olarak işlev gösterebilirler (Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Welch, Chen and Stallings, 2007; Yu et al., 2010). Onkomirlerden Ras genini regüle eden Let-7 ailesi ilk tanımlanan miRNA ailesidir (Esquela-Kerscher ve Slack, 2006). Tümör supresör miRNA'lardan miR-34a ve miR-96 primer tümörlerde baskılanmasına rağmen serumda mide kanserinde kontrol grubuna göre miR-34a'nın ekspresyonları artar. miR-29a'nın akciğer kanseri, HSK ve lösemide tümör supresör olarak rol oynamasına rağmen ovaryum kanseri ve kolorektal neoplazide plazmada ekspresyonları artar. Elde edilen veriler ışığında miRNA ekspresyon farklılıklarının kanda, kistik sıvıda, plazmada (Wang ve diğ., 2009), pankreas sıvısında, serumda, tükürükte ve idrarda biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca miRNA'larda oluşan polimorfizmler yüksek kanser risklerine de neden olabilirler. Bu konuda yapılan bir çalışmada HSK'da tek nokta mutasyonlarının miR-196a2 C-T ve miR-499 C-T değişimi belirlenmiştir. MiRNAlardaki bu nokta mutasyonları da ayrıca biyobelirteç olarak hastalıkların risklerinin değerlendirilmesinde kullanılabilir (Wang ve diğ., 2016).

Dolaşımdaki miRNA'lar ilk kez serumda biyobelirteç olarak yaygın büyük B hücreli lenfoma hastalarında denenmiştir. Sonrasında birçok farklı insan hastalıklarında miRNA'ların

ekspresyonları değerlendirilmiştir. Bu tip çalışmalarda mikroarray, Gerçek Zamanlı PZR ve Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojileri kullanılmıştır. Yeni Nesil Dizileme (NGS) ile elde edilen veriler ışığında yapılan bir çalışmada invaziv karsinomların (meme karsinoması tipi) kist sıvılarından elde edilen 13 adet mikroRNA tanımlanmıştır (Wang ve diğ., 2014) . Yine yapılan mikroarray çalışmalarında kronik pankreatit ile pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) ve kontrol örnekleri karşılaştırıldığında pankreas sıvısında miRNA'ların farklılıkları ortaya konmuştur. Akciğer kanseri hastalarında miR-10b, miR-141 ve miR-155'in kötü huylu tümörlerde iyi huylu tümörlere göre ekspresyonlarının oldukça artış gösterdiği rapor edilmiştir. Yine benzer şekilde karaciğer hastalıklarında olası tanı ve prognostik biyobelirteç olarak miR-1 ve miR-133b tanımlanmıştır. Yapılan bir çok çalışma göğüs kanseri lösemi, karaciğer kanseri, ovaryum kanseri, pankreas kanseri ve prostat kanseri gibi bir çok kanser türünde miRNA ekspresyonlarının değiştiğini göstermiştir (Wang ve diğ., 2016).

miRNA'lar, formalinle fıkse edilmiş parafine gömülü HSK dokularında ve bu hastaların serumlarında yüksek stabilite göstermektedir. Ayrıca karaciğer kanseri, melanoma, pankreatik kanser, papiller tiroid karsinoması ve böbrek tümörü gibi dokuların da parafine gömülü olan dokularında ve serum örneklerinde miRNA stabilitelerinin çok fazla olduğu ve bu sayede doku ve vücut sıvı örneklerinden hastalığın evresinin karakterizasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Katı tümör dokuları ve vücut sıvılarında miRNA'ların çoğunluğunun endojen RNase aktivitesinden korunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu da miRNA ekspresyon analizlerinin biyobelirteç olarak kanser ve diğer hastalıklarda değerlendirilebileceğini göstermiştir. Son yıllarda miRNAların tespiti ile ilgili Northern blot analizleri, in situ hibridizasyon analizleri, Gerçek Zamanlı PZR, miRNA mikroarray ve Yeni Nesil Dizileme (Wang et al., 2015) gibi pek çok analiz kullanılmaktadır (Tetzlaff ve diğ., 2007; Chen ve diğ., 2008; Barshack ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2014; Wang ve diğ., 2016).

Diagnostik alanda mikroRNA ile kullanılan diagnostik kitler kullanılmaktadır. Bunlar arasında plateletler ile ilgili hastalıkların ve platelet fonksiyonları üzerinde ilaçların etkileri ve toksik değişikliklerin analizlendiği miRNA ürünleri (<http://www.tamirna.com>); Mide kanseri, göğüs kanseri ve akciğer kanserinin tanısında kullanılan ürünler (<https://www.mirxes.com>; <http://gensignia.com/About/About-GENSIGNIA.aspx>); karaciğer toksisitesi ile ilgili miRNA markırlarının tarandığı bazı kitler (<https://sites.google.com/destinagenomics.com/>) ve bazı hastalıklarda (prostat kanseri vb) diagnostik ve prodiagnostik bir yazılım ile tümörün

agrefisliğinin ortaya konulduğu biyoinformatik çözümler (<http://www.miq.com.tr>) yer almaktadır.

Gerçekleştirilen çalışmada HBV DNA'nın log analizleri ve bu logların çalışılan 6 miRNA (hsa-miR-16, hsa-miR-28, hsa-miR-122, hsa-miR-221, hsa-miR-224, hsa-miR-501) için korelasyon analizleri çalışılmıştır. HBV DNA'sı 1 log'dan 7 log'a kadar var olan aralıklarla çalışılan 6 miRNA için herhangi bir korelasyon saptanmamıştır. Xu ve diğ., (2011), yaptığı çalışmalarda hsa-miR-21, hsa-miR-122 ve hsa-miR-223'ün HBV kantitasyonu ile çalışılmış ve hsa-miR-21 ile hsa-miR-122 için kronik hepatit B'li hastalarda ekspresyonlarının azaldığı, fakat hsa-miR-223 ekspresyonunda bir değişiklik olmadığı rapor edilmiştir (Xu ve diğ., 2011). Waidmann ve diğ., (2012), yaptığı bir çalışmada HSK olmayan fakat HBV DNA, HBs ve HBe antijenleri ile hsa-miR-122 ekspresyonu arasındaki ilişki çalışılmış ve bir korelasyon saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen veriler ışığında miR-122'nin ekspresyonu sağlıklı popülasyona göre hasta grubunda artmıştır. Çalışılan hasta grubunda HSK tanısı konulmuş grup bulunmamaktadır. Yapılan 2 çalışmada da miRNA çalışmaları serum değerleri üzerinden ve tüm HBV analizleri antijenler (HBe, HBs) üzerinden değerlendirilmiştir (Waidmann ve diğ., 2012). Waidmann ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HBV DNA değerleri karaciğer derneklerinin (EASL, AASLD, APASL) de tedavi algoritmasında kullandıkları bir parametre olan HBV DNA'nın 2.000 IU/mL'den az veya fazla olmasına göre değerlendirilmiştir. Bizim ise gerçekleştirdiğimiz çalışmadaki hedefimiz HBV DNA kantitasyonunun tedavi algoritmasındaki sınır değer (>2.000 IU/mL) olarak kullanılmasından farklı olarak HBV DNA'nın kantitasyonunun 1 logaritmalik yani 10 katlık aralıklarla (Tablo 4.1) serum örneklerinde değerlendirildiğinde çalışılan 6 miRNA için korelasyonunun ortaya konulup, korelasyon gösteren miRNA'lar için etkili oldukları yolların virüs kantitasyonu ile ilişkilerinin ortaya konulmasında ön veriler ortaya koyması amaçlanmıştır. Fakat sadece Waidmann ve diğ. Yaptığı çalışmada olduğu gibi sınır bir değer bu analizlerde kullanılması bu tip yolak ve HBV DNA kantitasyon ilişkilerinin aydınlatılmasında yorum yapmamıza yetecek kadar bilgi sağlayamamaktadır. Bununla birlikte Waidmann çalışmasında referans olarak kullandığı karaciğer derneklerinin verdiği HBV DNA < 2.000 IU/mL değeri sadece negatif örnekler için bir kriter olup zaten bu 3 derneğin farklı tedavi izlenceleri oluşturdıkları (Şekil 2.14) HBV DNA değerinin 2.000-20.000 IU/mL değerini ve yine tedavi için >20.000 IU/mL'nin de değerlendirildiği değerleri kapsamamakta bu da bu çalışmanın verilerin değerlendirilmesinde tüm tabloyu gösterememektedir. Ayrıca Arataki ve diğ., (2013), yaptığı çalışmada hsa-miR-122 ve hsa-miR-22 için HBsAg ve

HBeAg'lere ve HBV log değerleri ile korelasyon çalışılmış ve 2 miRNA için de HBV log değerleri arasında uyum bulunurken hsa-miR-122 ile HBsAg değerleri arasındaki korelasyonun daha güçlü olduğu ortaya konulmuştur. (Arataki ve diğ., 2013). Hsa-miRNA-122'nin akut ve kronik HBV ile ilişkisi haricinde HBV DNA'nın kantitasyon değeri ile diğer 5 mikroRNA'nın (miR-16, miR-28, miR-221, miR-224, miR-501) korelasyonu üzerinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yine yapılan bazı çalışmalarda epigenetik mekanizmaların HSK'da miR-122'nin diferansiyel ekspresyonuna etki edebileceğini göstermiştir. miR-122 promotörü, Hep3B hücre hatlarında HBV ile ilişkili HSK'da hipermetile olduğu gösterilmiştir (Jung ve diğ., 2011). HBV tarafından eksprese edilen HBx proteini hücrel metiltransferaz aktivitesini etkileyebilir ve değişik metilasyon paternlerinin oluşmasına katkıda bulunabilir (Jung ve diğ., 2010). Ayrıca buna ek olarak HBV ve HCV ile ilişkili HSK'daki bu epigenetik değişiklikler kanserin kökenlendiği farklı hücre tiplerinde farklı profil sergileyebilirler (Hsia ve diğ., 1994). miRNA-122, eğer HBV replikasyonunu baskırsa, HBsAg'nin titresi ile miRNA-122 arasında ters bir korelasyon ortaya çıkar. Ayrıca yine serumda meydana gelen miRNA-122 seviyeleri doğuştan gelen bağışıklık nedeniyle yüksek miRNA-122 seviyelerine neden olabilir. Bizim yaptığımız çalışmada da serum miRNA-122 ile serum HBV DNA log 3,4,5 ve 6 seviyelerinde bir korelasyon olsa da HBV DNA log 1,2 ve 7 ile miRNA-122 arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bunun bir diğer sebebi ise deney gruplarının HBsAg ve HBeAg değerleri bilinmemekle birlikte ilaç tedavisi altında olup olmadıklarının da bilinmemesidir. Daha düşük HBV DNA'ya sahip bireyin aslında daha yüksek HBV-DNA değerinden ilaç ile tedavi altına alındığı ile yeni enfeksiyona sahip olup-olmadığının ayrımının yapılamaması bize miRNA-122'nin bazı HBV-DNA log verileri ile uyumu açıklarken bazı kantitasyonlarda neden uyum gözlenmediğini de açıklayabilir. Ayrıca yapılan çalışmada tamamen Türkiye popülasyonu çalışılmıştır. Arataki ve diğ., (2013)'nin yaptığı çalışma Japonya'da; Waidmann ve diğ., (2011), çalışması Almanya'da ve Xu ve diğ., (2011) çalışması ise Çin'de gerçekleştirilmiştir. Bu da farklı HBV genotiplerinin (Türkiye'de D genotipi; Çin'de C ve B genotipleri; Japonya'da A ve C genotipleri ile Almanya'da A,J ve D genotipleri) (Sunbul, 2014) bu aşamada farklı miRNA profilleri ortaya çıkarabileceği ilerleyen çalışmalarda değerlendirilebilir. Farklı HBV genotiplerinin klinik hastalık karakteri, bulaşma yolları, kronik olma eğilimi, HbeAg pozitiflik düzeyi ve serokonversiyonu, HBsAg seroklirensi, histolojik aktivitesi, klinik değerlendirme (LC, HCC), İnterferon- α cevabı, serum HBV DNA seviyeleri, bazı mutasyonların (PC A1896,

T1762/A1764) görölmek sıklığı vb. bir çok klinik ve virolojik özelliğinin değıştiğı rapor edilmiştir (Sunbul, 2014).

Çalışmada miRNA normalizasyonu için 2 adet küçük RNA molekülü (snRNA U6 ve snoRNA U44) ve 1 adet mRNA (GAPDH) kullanılmıştır. GAPDH, relatif (göreceli) kantitasyon çalışmalarında (mRNA) referans gen olarak çalışılmasının yanında ayrıca bazı miRNA çalışmalarında da normalizasyon için kullanılmaktadır (Kim ve diğ., 2008). Görür ve arkadaşlarının 2013 yılında gerçekleştirdiğı bir çalışmada gastrik kanser ile ilgili 27 adet miRNA çalışılmış fakat bu miRNA'ların normalizasyonu serumda bir referans gen mRNA'sı ile gerçekleştirilmiştir (Ayşegül ve diğ., 2013). Fakat genom boyutu çok küçük olan miRNA'ların GAPDH v.b. referans genlere göre izolasyon performansları, stabiliteleri, revers transkripsiyonları ve PZR amplifikasyonları farklıdır (Masè ve diğ., 2017). Bu nedenle de çalışmaların çoğunda artık miRNA referans materyali olarak daha küçük genomlar (siRNA) kullanılmaktadır. Yine sadece çalışmaların bazılarında sadece miRNA normalizasyonu için birden fazla siRNA ve mRNA çalışıldığı görölmüştür. Bu çalışmalarda da normalizasyon için kullanılacak moleküllerin doku ve çalışmaya spesifik seçilmesi gerektiğı ortaya çıkmaktadır (Mestdagh ve diğ., 2009; Brattelid ve diğ., 2019). Bu çalışmada hem GAPDH mRNA'yı hem de 2 küçük RNA molekülünü (U6 ve SNORD 44) gerek serum gerekse doku örneklerinde normalizasyon için kullanılabilirlikleri değerlendirilmiştir. U6 için serum ve karaciğer doku örnekleri için normalizasyonda kullanılabileceğı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Benz ve diğ., 2013; Lamba ve diğ., 2014). U6, SNORD44 ve GAPDH ile karaciğer dokusunda ve serumda yapılan herhangi bir normalizasyon verisine rastlanmamıştır. Bu çalışma ile U6'nın SNORD44'e göre karaciğer dokusu ve serumda normalizasyon için daha uygun olduğı gösterilmiştir. GAPDH ise zaten nükleik asit materyalinin daha uzun olması sebebiyle miRNA normalizasyonundan çok total RNA'nın izole edilip edilmediğı ile ilgili iç kontrol olarak kullanılabilir. Ayrıca yapılan farklı çalışmalarda gösterilen farklı ekspresyon seviyelerinin uygun olmayan normalizasyon metodu olduğı fikri bu optimizasyon verisinden elde edilebilir.

Ayrıca elde edilen veriler ışığında miRNA-28'in HSK'da biyobelirteç olarak kullanılabileceğı yönünde sonuçlar elde edilmiştir. Gerek akut gerekse kronik HBV ile ilgili tanımlanmış ve ekspresyonlarında değışiklikler gözlenmiş mikroRNA'lar arasında miRNA-28 bulunmamaktadır (Zhang ve diğ., 2011). Yapılan çalışmalarda miRNA-28 için HSK'lı dokularda ekspresyonlarında azalma gösterilmiştir fakat bu çalışmalar serum düzeyinde

denenmemiştir (Zhou ve diğ., 2016; Murakami ve diğ., 2006). Aynı çalışma grubunda hem HSK dokusunda hem de serum örneklerinde yapılmış bir kombine çalışmaya rastlanmamıştır. Bu veriler ışığında miR-28 HSK'da non-invaziv bir tarama yöntemi olarak değerlendirilebileceği sonucu çıkmaktadır. MikroRNA ve biyolojik süreçleri de içeren databaz analizi (miRPathDB v1.1) yapıldığında hsa-miR-28 için protein otofosforilasyonu, peptid ve hormon sekresyonu, glikogenezin regülasyonu, hücre büyüklüğünün regülasyonu gibi süreçlerde rol oynadığı gibi kanser oluşumu ve virüs konakçı mekanizması ile ilgili bazı süreçlerde de (Ras protein sinyal transdüksiyonunun regülasyonu, kalsiyum iyon cevabı, virüs tarafından konakçı hücrelerin modülasyonu, konakçı hücresel süreçlerin modülasyonu, hippo sinyalleşme ve hücre morfogenezini de içeren farklılaşmaların pozitif regülasyonu) rol oynadığı rapor edilmiştir¹.

Elde edilen veriler ışığında miR-16 için HSK'lı dokuda ekspresyon artışına rastlanmış fakat HBV DNA pozitif HSK tanısı konulmuş ve HBV DNA pozitif HSK tanısı olmayan çalışma grubunda anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. miR-221 ve miR-501 için ise yine doku ekspresyonları anlamlı derecede yüksek olmasına rağmen serum düzeylerinde biyobelirteç olarak kullanımını destekleyecek istatistiksel veriler elde edilmemiştir.

Yapılan çalışmada miR-122 için ise doku ve serumda HBV DNA pozitif, HSK tanısı konulmuş veya konulmamış çalışma grubunda ekspresyonlarının azaldığı sonucu çıkmaktadır. Bu veriler aksine tek rastlanan veri 2012 yılında Waidmann ve diğ. yaptığı çalışmadır. Çalışmada serum örnekleri kullanılmış ve HBe antijeni taşıyan serum örnekleri ile aynı örneklerin ALT seviyelerine göre miR-122 ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada normalizasyon için miR-16 kullanılmıştır. Bu çalışma diğer incelenen çalışmalar ve tez kapsamında elde ettiğimiz bulgular ile çelişmektedir. Gerçekleştirilen yolak çalışmalarında, HBx-LINE1 transkriptinin HBV replikasyonunda doğrudan HBV transkriptlerini hedef alarak azalmasına neden olan miR-122'yi inhibe ettiğini göstermektedir (Zhang ve diğ., 2016). Ayrıca yine yapılan çalışmalar epitelial mezenşimal değişimlerde Snail 1 ve Snail 2 için, sinyal yollarında WNT1 genin, CREB1 ve BCL9 genlerinin hedeflerinden olduğunu göstermiştir (Fu & Calin, 2018). Gerçekleştirdiğimiz tez kapsamında denenen 6 miRNA'dan bir tanesi olan miR-16 kontrol ve grup 1 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir (Şekil 4.3).

¹<https://mpd.bioinf.uni-sb.de/overview.html> [Ziyaret Tarihi: 19.03.2019]

Ekspresyon değişikliği deney grubuna göre değişim gösteren miR-16'nın Waidmann ve arkadaşlarının çalışmalarında normalizasyon için kullanılması diğer çalışmaların aksine HSK pozitif serum örneklerinde miR-122 ekspresyonunda artış analizlenmesine sebep olmuş olabilir. Bununla birlikte snRNA U6'nın HSK olgusunda serumda normalizasyon için kullanılan pek çok çalışma olduğu gibi (Benz ve diğ., 2013; Lamba ve diğ., 2014) aynı zamanda yine HSK'da miR-16'nın ekspresyon farklılığının analizlenmesi ve biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi için de çalışmalar bulunmaktadır (Wu ve diğ., 2015; Ge ve diğ., 2014). Genel olarak bu veriler ışığında miR-224, miR-501'nin ekspresyon fazlalığının ve miR-122'nin ekspresyon azlığının karaciğer hasarında kullanılabilecek bir belirteç olabileceği fakat kronik HBV enfeksiyonuna bağlı HSK'da serum belirteci olarak kullanılamayacağı sonucu çıkmaktadır. Li ve diğ., yaptığı bir çalışmada miR-221'in HSK'da serumda arttığı ile ilgili sonuçlar elde edilmiştir. Bu artışlarla ilgili ve bu artışların tümörün ileri safhası ile ilgili olduğuna dair bilgiler mevcuttur (Gramantieri ve diğ., 2008; Li ve diğ., 2011). Yine yapılan bazı çalışmalarda miR-221 için kronik hepatit B tanısı konulmuş hasta grubunda ekspresyonlarının çok daha fazla olduğu ile ilgili veriler de mevcuttur (Sohn ve diğ., 2015). Bu veri bizim sonuçlarımızı da desteklemekle birlikte yaptığımız çalışmada ek olarak doku örnekleri de kullanılması ve dokuda miR-221 ekspresyonlarının da incelenmesi değerli bir bulgudur.

Ayrıca elde edilen veriler ışığında miR-224'ün HBV enfeksiyonu ve HSK'da biyobelirteç olarak kullanılabileceği yönünde sonuçlar elde edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda HSK doku ve serum örneklerinde miR-224 ile ilgili benzer sonuçlar elde edilmesine rağmen (Murakami ve diğ., 2006; .Wang ve diğ., 2008, Huang ve diğ., 2009 ve Pineau ve diğ., 2010) miR-224'ün HSK tanısı konulmamış HBV DNA'sı pozitif olan çalışma grubu ile istatistiksel verilerine rastlanmamıştır. Fakat yapılan çalışmalarda HBV ilişkili HSK'da düşük otofaj aktivitesi nedeniyle miR-224'ün birikimi ortaya konmuştur (Lan ve diğ., 2014). Bu çalışma, HBV DNA'nın pozitif olduğu fakat HSK gelişimi tanımlanmamış çalışma grubunda HSK tanısı konmuş gruba ve kontrol grubuna göre ekspresyonlarının daha fazla olması miR-224'ün HBV enfeksiyonu ile de doğrudan ilişkili olduğunu istatistiksel olarak göstermiştir. Bu da gelecekte yapılacak çalışmaları miR-224'ün HBV ile ilişkisi ve HBV'nin HSK gelişiminde etkisinde bu miRNA'nın rolü üzerine çekebilir.

Tez kapsamında değerlendirilen bir diğer veri ise lezyon boyutu ile miRNA'ların ekspresyon değişimleridir. Bu analizlerde miR-16 için 2 cm; miR-28 için 1,4 cm; miR-224 için 4,5 cm; miR-122 için 3,6 cm sonrası lezyon büyüklüklerinde ekspresyon seviyelerinde miRNA'nın ekspresyon profiline göre artış veya azalışlar anlamlı derecede farklılıklar göstermektedirler. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde miRNA'lar ve kanserli karaciğer doku lezyon boyutları ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca özellikle cerrahi müdahale de dahil olmak üzere radyofrekans ablasyon, transmembran kemoembolizasyon ve etil alkol enjeksiyonu gibi bazı tedavi yöntemlerinin 3 cm'nin altında çok etkili olduğu verisi ile birleştirildiğinde bu ekspresyon paternleri tümörün yaklaşık boyutunu anlamak için uygun bir parametre olarak değerlendirilebilir (Lupo ve diğ., 2007; Raza ve Sood, 2014).

Gelecekte miRNA ile ilgili yapılan çalışmalar, bu tez kapsamında da olduğu gibi, biyobelirteç validasyonu aşamasından klinik validasyon aşamalarına geçerek daha çok gerçek örnek ve klinik vaka ile çalışmalar sağlanması için tarama yöntemi olması konusunda destekçi olması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Akiba, S. & Hirayama, T., 1990, Cigarette smoking and cancer mortality risk in Japanese men and women-results from reanalysis of the six-prefecture cohort study data, *Environ Health Perspect.*, 87,19-26.
- Altekruse, S.F., McGlynn, K.A., Reichman, M.E., 2009, Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005, *J Clin Oncol*, 27(9), 1485-91.
- Arataki, K., Hayes, C.N., Akamatsu, S., Akiyama, R., Abe, H., Tsuge, M., Miki, D., Ochi, H., Hiraga, N., Imamura, M., Takahashi, S., Aikata, H., Kawaoka, T., Kawakami, H., Ohishi, W. & Chayama, K., 2013, Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B, *J Med Virol.*, 85(5),789-798.
- Aravalli, R.N., Steer, C.J. & Cressman, N.K., 2008, Molecular Mechanisms of Hepatocellular Carcinoma, *Hepatology*, 48(6), 2047-2063.
- Arbuthnot, P. and Kew, M., 2001, Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma, *Int J Clin Exp Pathol*, 82(2), 77–100.
- Ayadpoor, D.O., Sarah, M. & Hall, D.O., 2011, Sexually transmitted diseases, *Acofp*, 3(6), 253-265.
- Barbare, J. C., Bouche, O., Bonnetain, F., Dahan, L., Lombard, C., Faroux, R., Raoul, J.L., Cattani, S., Lemoine, A., Blanc, J.F., Bronowicki, J. P., Zarski, J.P., Cazorla, S., Gargot, D., Thevenot, T., Diaz, E., Bastie, A., Aparicio, T., Bedenne, L., 2009, Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with long-acting octreotide: A phase III multicentre, randomised, double blind placebo-controlled study, *Eur J Cancer*, 45(10),1788–1797.
- Bartel, D.P., 2018, Metazoan MicroRNAs, *Cell*; 173 (1), 20-51.
- Bialecki, E. S. and Di Bisceglie, A. M., 2005, Diagnosis of hepatocellular carcinoma', *Hpb*, 7(1),26–34.
- Borzio, M., Borzio, F., Macchi, R., Croce, A.M., Bruno, S., Ferrari, A. & Servida, E., 1994, The evaluation of fine-needle procedures for the diagnosis of focal liver lesions in cirrhosis, *J Hepatol.*,20(1),117-121.
- Boyer, T.D., Manns, M.P. Terrault, N. & Sanyal A.J., 2012, Zakim&Boyer's Hepatology a Textbook of Liver Disease, *Liver and Immun System*, Elsevier, China, ISBN: 9780 3234 4657, 129-141.
- Barshack, I, Lithwick-Yanai, G., Afek, A., Rosenblatt, K., Tabibian-Keissar, H., Zepeniuk, M., Cohen, L., Dan, H., Zion, O., Strenov, Y., Polak-Charcon, S. & Perelman, M., 2010, MicroRNA expression differentiates between primary lung tumors and metastases to the lung, *Pathol Res Pract*, ,206,578–584.
- Benz, F., Roderburg, C., Vargas, C. D, Vucur, M., Gautheron, J., Koch, A., Zimmermann, H., Janssen, J., Nieuwenhuijsen, L., Luedde, M., Frey, N., Tacke, F., Trautwein, C. & Luedde, T., 2013, U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis, *Exp Mol Med.*, 45(9),1-9.

- Brancatelli, G., Baron, R.L., Peterson, M.S. & Marsh, W., 2003, Helical CT screening for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: frequency and causes of false-positive interpretation, *AJR Am J Roentgenol.*, 180(4),1007-1014.
- Brattelid, T., Aarnes, E.K., Helgeland, E., Guvaåg, S., Eichele, H. & Jonassen, A.K., 2011, Normalization strategy is critical for the outcome of miRNA expression analyses in the rat heart, *Physiol Genomics.*, 43(10),604-610.
- Bréchet, C., Gozuacik, D., Murakami, Y., and Bréchet, P.P., 2000, Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC), *Semin Cancer Biol.*, 10(3), 211–231.
- Bruix, J., Sherman, M., Llovet, J.M., Beaugrand, M., Lencioni, R., Burroughs, A.K., Christensen, E., Pagliaro, L., Colombo, M. & Rodés, J., 2001, Clinical Management of Hepatocellular Carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference, *J Hepatol.*, 35(3), 421-430.
- Bruix, J. & Sherman, M., 2011, Management of hepatocellular carcinoma: an update, *Hepatology.*, 53(3), 1020-1022.
- Budhu, A., Forgues, M., Ye, Q.H., Jia, H.L., He, P., Zanetti, K.A., Kammula, U.S., Chen, Y., Qin, L.X., Tang, Z.Y. & Wang, X.W., 2006, Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment, *Cancer Cell.*, 10(2), 99-111.
- Buendia, M.A., 2002, Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects, *Med Pediatr Oncol.*, 39(5),530-535.
- Carr, B.I., Akkiz, H., Üsküdar, O., Yalçın, K., Guerra, V., Kuran, S., Karaoğullarından, Ü., Altıntaş, E., Özakyol, A., Tokmak, S., Ballı, T., Yücesoy, M., Bahçeci, H.İ., Ülkü, A., Akçam, T., Yalçın, K., Ekin, N., Şimşek, H., Örmeci N., Sosuz, A., Demir, M., Kılıç, M., Uygun, A., Demir, A., Delik, A., Arslan, B., Doran, F., Yılmaz, S., ve Tokat, Y., 2018, HCC with low- and normal-serum alpha-fetoprotein levels, *Clin Pract*, 15(1), 453-464.
- Caturelli, E., Ghittoni, G., Roselli, P., De Palo, M. & Anti, M., 2004, Fine needle biopsy of focal liver lesions: the hepatologist's point of view, *Liver Transpl.*, 10(2),26-29.
- Chan,H.L., Wong, M.L., Hui, A.Y., Hung, L.C., Chan, F.K. & Sung, J.J., 2003, 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.*, 41(3), 1277-1279.
- Chalasani, N., Horlander, J.C., Said, A., Hoen, H., Kopecky, K.K., Stockberger, S.M., Manam, R., Kwo, P.Y. & Lumeng, L., 1999, Screening for hepatocellular carcinoma in patients with advanced cirrhosis, *Am. J.Gastroenterol.*, 94(10),2988–2993.
- Chen, M.T., Billaud,J.N., Sallberg, M., Guidotti, L.G., Chisari, F.V., Jones, J., 2004, A function of HBV precore protein is to regulate immune response to core antigen., *Proc Natl Acad Sci*, 2004; 101(41):14913-14918.
- Chen, J., Han, Y., Xu, C., Xiao, T. & Wang, B., 2015, Effect of type 2 diabetes mellitus on the risk for hepatocellular carcinoma in chronic liver diseases: a meta-analysis of cohort studies, *Eur J Cancer Prev.*, 24(2),89-99.

- Cheng, A.L., Kang, Y.K., Chen, Z., Tsao, C.J., Qin, S., Kim, J.S., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, T.S., 2009, 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*, 10, 25–34.
- Choi, B.I., Kim, A.Y., Lee, J.Y., Kim, K.W., Lee, K.H., Kim, T.K. & Han, J.K., 2002, Hepatocellular Carcinoma: Contrast Enhancement With Levovist, *J Ultrasound Med.*, 21(1), 77-84.
- Choi, J.Y., Lee, J.M. & Sirlin, C.B., 2014, CT and MR imaging diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma: part I. Development, growth, and spread: key pathologic and imaging aspects, *Radiology*, 272(3), 635-654.
- Çolakoğlu, Ş., 2015, *Spondiloartropatilerin Genetik ve Epigenetik Yaklaşımına İncelenmesi: Ankilozan Spondilitte Epigenetik Modifiye Edicilerin Ekspresyonu*, Yüksek Lisans, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- De Minicis, S., Day, C. & Svegliati-Baroni, G., 2013, From NAFLD to NASH and HCC: pathogenetic mechanisms and therapeutic insights, *Curr Pharm Des.*, 19(29), 5239-5249.
- Dhanasekaran, R., Bandoh, S. & Roberts, L.R., 2016, Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances, *fl000research*, 5(879), 1-15.
- Ding, M. & Wang, X., 2017, Antagonism between Hedgehog and Wnt signaling pathways regulates tumorigenicity, *Oncol Lett.*, 14(6), 6327–6333.
- Doğan, R. & Aktaş, P.G., 2016, Epigenetik Mekanizmalar ve Hepatoselüler Karsinoma, *Maltepe Med. J.*, 8(3), 29-35.
- Dong, H., Zhang, L., Qian, Z., Zhu, X., Zhu, G., Chen, Y., Xie, X., Ye, Q., Zang, J., Ren, Z., and Ji, Q., 2015, Identification of HBV-MLL4 Integration and Its Molecular Basis in Chinese Hepatocellular Carcinoma, *PloS one.*, 10(4), 1-16.
- Du, J., Tong, A., Wang, F., Cui, Y., Li, C., Zhang, Y. & Yan, Z., 2016, The Roles of PI3K/AKT/mTOR and MAPK/ERK Signaling Pathways in Human Pheochromocytomas, *Int J Endocrinol.*, 1-8.
- Durand, F., Regimbeau, J.M., Belghiti, J., Sauvanet, A., Vilgrain, V., Terris, B., Moutardier, V., Farges, O. & Valla, D., 2001, Assessment of the benefits and risks of percutaneous biopsy before surgical resection of hepatocellular carcinoma, *J Hepatol.*, 35(2), 254-258.
- El-Serag, H. B. and Rudolph, K. L., 2007, Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis, *Gastroenterology*, 132(7), 2557–2576.
- El-Serag, H. B., 2012, Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology*, 142(6), 1264-1273.
- Endo, M., Yasui, K., Zen, Y., Gen, Y., Zen, K., Tsuji, K., Dohi, O., Mitsuyoshi, H., Tanaka, S., Taniwaki, M., Nakanuma, Y., Arii, S. & Yoshikawa, T., 2013, Alterations of the SWI/SNF chromatin remodelling subunit-BRG1 and BRM in hepatocellular carcinoma, *Liver Int.*, 33(1), 105-117.
- Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J., 2006, Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer, *Nat. Rev. Cancer.*, 6(4), 259–269.

- Farazi, P.A. & DePinho, R.A., 2006, Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment, *Nat Rev Cancer*, 6(9),674-687.
- Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I. & Donato, F., 2004, Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors, *Gastroenterology*, 127 (5), 35-50.
- Feng, Q., Stern, J.E., Hawes, S.E., Lu, H., Jiang, M. & Kiviat, N.B., 2010, DNA methylation changes in normal liver tissues and hepatocellular carcinoma with different viral infection, *Exp Mol Pathol.*, 88(2), 287-292.
- Ferenci, P., Fried, M., Labrecque, D., Bruix, J., Sherman, M., Omata, J.M., Heathcote, J., Piratsivuth, T., Kew, M., Otegbayo, J.A., Zheng, S.S., Sarin, S., Hamid, S.S., Modawi, B., Fleig, W., Fedail, S., Khan, A., Malfertheiner, P., Lau, J.J.G., Carillo, F.J., Krabshuis, J. and Le Mair, A., 2010, Hepatocellular Carcinoma (HCC) A Global Perspective, *J Clin Gastroenterol*, 44(4), 239-45.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. and Bray, F., 2015., Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer*, 136(5), 359-86.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J. & Zeller, R., 2008, Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections, *CSH Protocols*,3(5),1-3.
- Forner, A., Reig, E., Lope, C.R. and Bruix, J., 2010, Current Strategy for Staging and Treatment: The BCLC Update and Future Prospects, *Seminars In Liver Dis*, 30(1), 61-74.
- Fu, X. & Calin, G.A., 2018, miR-122 and hepatocellular carcinoma: from molecular biology to therapeutics, *EBioMedicine*, 37, 17-18.
- Ge, W., Yu, D.C., Li, Q.G., Chen, X., Zhang, C.Y. & Ding, Y.T., 2014, Expression of serum miR-16, let-7f, and miR-21 in patients with hepatocellular carcinoma and their clinical significances, *Clin Lab.*, 60(3), 427-434.
- Gelband, H., Jha, P., Sankaranarayanan, R., Horton, S., 2015, *Cancer: Disease Control Priorities*, The World Bank, Washington, ISBN: 978-1-4648-0369-7
- Ghidini, M. & Braconi, C., 2015, Non-Coding RNAs in Primary Liver Cancer, *Front Med.*, 2(36),1-12.
- Görür, A., Fidancı, S.B., Unal, N.D., Ayaz, L., Akbayır, S., Yaroğlu, H.C., Dirlik, M., Serin, M.S. & Tamer, L., 2013, Determination of plasma microRNA for early detection of gastric cancer, *Mol Biol Rep.*, 40: 2091-2096.
- Graham, R.P., Jin, L., Knutson, D.L., Kloft-Nelson, S.M., Greipp, P.T., Waldburger, N., Roessler, S., Longerich, T., Roberts, L.R., Oliveira, A.M., Halling, K.C., Schirmacher, P. & Torbenson, M.S., 2015, DNAJB1-PRKACA is specific for fibrolamellar carcinoma, *Mod Pathol.*, 28(6), 822-829.
- Gramantieri, L., Fornari, F., Callegari, E., Sabbioni, S., Lanza, G., Croce, C.M., Bolondi, L. & Negrini, M., 2008, MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma, *J Cell Mol Med.*,12(6),2189-2204.
- Gramantieri, L., Fornari, F., Ferracin, M., Veronese, A., Sabbioni, S., Calin, G.A., Grazi, G.L., Croce, C.M., Bolondi, L. and Negrini, N., 2009, MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality, *Clin Cancer Res*, 15(16),5073-5081.

- Gupta, S., Bent, S. & Kohlwes, J., 2003, Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. A systematic review and critical analysis, *Ann Intern Med.*, 139(1), 46-50.
- Hai, H., Tamori, A. & Kawada, N., 2014, Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis, *World J Gastroenterol.*, 20(20), 6236-6243.
- Hanahan, D., 2014, Rethinking the war on cancer, *Lancet.*, 383, 558–563.
- Hanazaki, K., Kajikawa, S., Koide, N., Adachi, W. & Amano, J., 2001, Prognostic factors after hepatic resection for hepatocellular carcinoma with hepatitis C viral infection: univariate and multivariate analysis, *Am J Gastroenterol.*, 96(4), 1243-1250.
- Hartmann, D., Srivastava, U., Thaler, M., Kleinhans, K.N., N'kontchou, G., Scheffold, A., Bauer, K., Kratzer, R.F., Kloos, N., Katz, S.F., Song, Z., Begus-Nahrmann, Y., Kleger, A., von Figura, G., Strnad, P., Lechel, A., Günes, C., Potthoff, A., Deterding, K., Wedemeyer, H., Ju, Z., Song, G., Xiao, F., Gillen, S., Schrezenmeier, H., Mertens, T., Ziol, M., Friess, H., Jarek, M., Manns, M.P., Beaugrand, M. & Rudolph, K.L., 2011, Telomerase gene mutations are associated with cirrhosis formation, *Hepatology.*, 53(5):1608-1617.
- Hayat, M.J., Howlader, N., Reichman, M.E. & Edwards, B.K., 2007, Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program, *Oncologist.*, 12(1), 20-37.
- He, C., Zhang, J., Xie, D., Ye, H., Xiao, Z., Cai, M., Xu, K., Zeng, Y., Li, H. & Wang, J., 2012, High expression of trimethylated histone H3 lysine 4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma, *Hum. Pathol.*, 43(9), 1425-1435.
- Hellard, M.E., Chou, R. and Easterbrook, P., 2017, WHO guidelines on testing for hepatitis B and C – meeting targets for testing, 17(1), 1-7.
- Homma, S., Komita, H., Sagawa, Y., Ohno, T. & Toda, G., 2005, Antitumour activity mediated by CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes against MHC class II-negative mouse hepatocellular carcinoma induced by dendritic cell vaccine and interleukin-12, *Immunology.*, 115(4), 451-461.
- Honeyman, J.N., Simon, E.P., Robine, N., Chiaroni-Clarke, R., Darcy, D.G., Gleason, C.E., Murphy, J.M., Rosenberg, B.R., Teegan, L., Takacs, C.N., Botero, S., Belote, R., Germer, S., Emde, A.K., Vacic, V., Bhanot, U., LaQuaglia, M.P. & Simon, S.M., 2014, Detection of a recurrent DNAJB1-PRKACA chimeric transcript in fibrolamellar hepatocellular carcinoma, *Science.*, 384(6174), 1010-1014.
- Hoshida, Y., Nijman, S.M., Kobayashi, M., Chan, J.A., Brunet, J.P., Chiang, D.Y., Villanueva, A., Newell, P., Ikeda, K., Hashimoto, M., Watanabe, G., Gabriel, S., Friedman, S.L., Kumada, H., Llovet J.M & Golub, T.R., 2009, Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.*, 69(18), 7385-7392.
- Howard, A., Liebman, M.D., Barbara, C., Furie, P.D., Myron, J., Tong, M.D., Rita, A., Blanchard, M.D., Kwang-Juei, L.M., Shou-Dong, L., Michael, S., Coleman, B.S. & Furie, B., 1978, Des- γ -carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma, *Marker of Hepatocellular Carcinoma*, 310(22), 1427-1431.
- Hsia, C. C., Thorgeirsson, S. S. & Tabor, E., 1994, Expression of Hepatitis B Surface and Core Antigens and Transforming Growth Factor-cx in “Oval Cells” of the Liver in Patients With Hepatocellular Carcinoma, *J. Med. Virol.*, 1-6.

- Huang X.H., Wang Q., Chen J.S., 2009, Bead-based microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma: miR-338 is downregulated., *Hepatol. Res.*, 39, 786–794.
- Janevska, D., Chaloska-ivanova, V. & Janevski, V., 2015, Hepatocellular Carcinoma: Risk Factors, Diagnosis and Treatment, *Maced J Med Sci.*, 3(4), 732–736.
- Jayalakshmi, M., Kalyanaraman, N. & Pitchappen, R., 2013, Hepatitis B Virus Genetic Diversity: Disease Pathogenesis, *Viral Replication.*, 69-82.
- Johnson, P.J., 2001, The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma, *Clin Liver Dis.*, 5(1), 145-159.
- Jung, C.J., Iyengar, S., Blahnik, K.R., Ajuha, T.P., Jiang, J.X., Farnham, P.J. & Zern, M., 2011, Epigenetic Modulation of miR-122 Facilitates Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Hepatocellular Carcinoma Proliferation, *Plos One.*, 6(11).
- Jung, J. K., Park, S. & Jang, K. L., 2010, Hepatitis B virus X protein overcomes the growth-inhibitory potential of retinoic acid by downregulating retinoic acid receptor- β 2 expression via DNA methylation, 493–500.
- Kashyap, R., Jain, A., Nalesnik, M., Carr, B., Barnes, J., Vargas, H.E., Rakela, J. & Fung, J. &, 2001, *Dig Dis Sci.*, 46(8), 1709-1713.
- Kew, M.C., 2013, Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma, *J Gastrointestin Liver Dis.*, 22(3), 305-310.
- Kid-Ljunggren, K. Miyakawa, Y. & Kidd, A.H., 2002, Genetic variability in hepatitis B viruses, *J Gen Virol.*, 83(6), 1267-1280.
- Kim, D.H., Saetrom, P., Snøve, O. & Rossi, J.J., 2008, MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci*, 105(42), 16230-16235.
- Kim, S.H., Lim, H.K., Lee, W.J., Cho, J.M. & Jang, H.J., 2000, Needle-tract implantation in hepatocellular carcinoma: frequency and CT findings after biopsy with a 19.5-gauge automated biopsy gun, *Abdom Imaging.*, 25(3), 246-250.
- Kojiro, M., Wanless, I.R., Alves, V., Badve, S., Balabaud, C., Bedosa, P., Bhathal, P., Bioulac-Sage, P., Brunt, E.M., Burt, A.D., Craig, J.R., Dhillon, A., Ferrell, L., Geller, S.A., Goodman, Z.D., Gouw, A.S.H., Guido, M., Guindi, M., Hytiroglou, P., Kage, M., Kondo, F., Kudo, M., Lauwers, G.Y., Nakano, M., Paradis, V., Park, Y.N., Quaglia, A., Roncalli, M., Roskams, T., Ruebner, B., Sakamoto, M., Saxena, R., Theise, N.D., Thung, S. & Taniakos, D., 2009, Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: A report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia, *Hepatology.*, 49(2), 658-664.
- Kondo, Y., Shen, L., Suzuki, S., Kurokawa, T., Masuko, K., Tanaka, Y., Kato, H., Mizuno, Y., Yokoe, M., Sugauchi, F., Hirashima, N., Orito, E., Osada, H., Ueda, R., Guo, Y., Chen, X., Issa, J.P. & Sekido, Y., 2007, Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas, *Hepatol Res.*, 37(11), 974-983.
- Kosaka, N., Iguchi, H. and Ochiya, T., 2010, Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis, *Cancer Sci.*, 101(10), 2087–2092.

- Krinsky, G.A., Lee, V.S., Theise, N.D., Weinreb, J.C., Rofsky, N.M., Diflo, T. & Teperman, L.W., Hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules in patients with cirrhosis: prospective diagnosis with MR imaging and explantation correlation, *Radiology*, 219(2),445-454.
- Lamba, V, Ghodke-Puranik, Y., Guan, W. & Lamba, J.K., 2014, Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation, *BMC Res. Notes*, 7(129),1-10.
- Lan, S.H., Wu, S.Y., Lin, X.Z., Su, I.J., Tsai, T.F., Lin, Y.J., Wu, C.T., Liu, H.S., 2014, Autophagy-preferential degradation of MIR224 participates in hepatocellular carcinoma tumorigenesis., *Autophagy*, 10(9):1687-1689.
- Larsson, S.C. & Wolk, A., 2007, Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies, *Br. J. Cancer*, 97(7), 1005-1008.
- Lawrie, C. H., Soneji, S., Marafioti, T., Cooper, C.D., Palazzo, S., Paterson, J.C., Cattan, H., Enver, T., Mager, R., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., Hatton, C.S., 2007, MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma, *Int. J. Cancer*, 121(5), 1156–1161.
- Lee, K.H., O'Malley, M.E., Haider, M.A. & Hanbidge, A., 2004, Triple-phase MDCT of hepatocellular carcinoma, *Am. J. Roentgenol.*, 182(3),643-649.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75 (5), 843-54.
- Lee, Y.C., Cohet, C., Yang, Y.C., Stayner, L., Hashibe, M. & Straif, K., 2009, Meta-analysis of epidemiologic studies on cigarette smoking and liver cancer, *Int. J. Epidemiol.*, 38(6), 1497-1511.
- Lemon, S.M. & McGivern, D.R., 2012, Is Hepatitis C Virus Carcinogenic?, *Gastroenterology*, 142(6), 1274-1278.
- Levrero, M. and Zucman-Rossi, J., 2016, Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma, *Journal of Hepatology*, 64, 84-101.
- Li, L., Hu, Z. & Zhou, Z., 2010, Serum microRNA Profiles Serve as Novel Biomarkers for HBV Infection and Diagnosis of HBV-Positive Hepatocarcinoma, *Cancer Res.*, 70, 9798-9807.
- Li, J., Wang, Y., Yu, W., Chen, J. and Luo, J., 2011, Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 406: 74-78.
- Li, S. & Mao, M., 2013, Next generation sequencing reveals genetic landscape of hepatocellular carcinomas, *Cancer Lett.*, 340(2), 247-253.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25(4), 402-408.
- Llovet, J. M., Bisceglie, D., Adrian, M., Bruix, J., Barnett, S., Kremer, B.S., Lencioni, R., Zhu, A.X., Sherman, M., Schwartz, M., Lotze, M., Talwalkar, J., Gores, G.J., 2008, Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.*, 100(10), 698–711.
- Llovet, J.M., Burroughs, A., and Bruix, J., 2016, Hepatocellular Carcinoma: Contrast Enhancement With Levovist, *J. Ultrasound Med.*, 21,77-84.

- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R. and Golub, T.R., 2005, MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature*, 435(7043), 834–838.
- Lupo, L., Panzera, P., Giannelli, G., Memeo, M., Gentile, A., and Memeo, V., 2007, Single hepatocellular carcinoma ranging from 3 to 5 cm: radiofrequency ablation or resection?, *HPB*, 9(6):429-434.
- Ma, L., Chua, M.S., Andrisani, O. & So, S., 2014, Epigenetics in hepatocellular carcinoma: An update and future therapy perspectives, *WJG*, 20(2), 333-345.
- Macfarlane, L. and Murphy, P. R., 2010, MicroRNA : Biogenesis , Function and Role in Cancer, *Curr Genomics*, 11(7), 537–561.
- Marrero, J.A., Su, G.L., Wei, W., Emick, D., Conjeevaram, H.S., Fontana, R.J. & Lok, A.S., 2003, Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients, *Hepatology*, 37(5),1114-1121.
- Mase, M., Grasso, M., Avogaro, L., D’Amato, E., Tessarolo, F., Graffigna, A., Denti, M.A. & Ravelli, F., 2017, Selection of reference genes is critical for miRNA expression analysis in human cardiac tissue. A focus on atrial fibrillation, *Sci. Rep.*,7,1-10.
- Meng, X., Franklin, D.A., Dong, J. & Zhang, Y., 2014, MDM2–p53 Pathway in Hepatocellular Carcinoma, *Cancer Res.*, 74 (24), 7161-7168.
- Mestdagh, P., Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F. & Vandesompele, J., 2009, A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization, *Genome Biol.*,10(64).
- Migita, K., Miyazoe, S., Maeda, Y., Daikoku, M., Abiru, S., Ueki, T., Yano, K., Nagaoka, S., Matsumoto, T., Nakao, K., Hamasaki, K., Yatsuhashi, H., Ishibashi, H. & Eguchi, K., 2005, Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection--association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma, *J Hepatol.*, 42(4), 505-510.
- Mitchell, P. S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008, Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(30),10513–10518.
- Moore, K.P. & Aithal, G.P., 2006, Guidelines on the management of ascites in cirrhosis, *Gut*, 55(6), vi1-vi12.
- Moshiri, F., Salvi, A., Gramantieri, L., Sangiovanni, A., Guerriero, P., De Petro, G., Bassi, C., Lupini, L., Sattari, A., Cheung, D., Veneziano, D., Nigita, G., Shankaraiah, R.C., Portolani, N., Carcoforo, P., Fornari, F., Bolondi, L., Frassoldati, A., Sabbioni, S., Colombo, M., Croce, C.M., Negrini, M., 2018, Circulating miR-106b-3p, miR-101-3p and miR-1246 as diagnostic biomarkers of hepatocellular carcinoma, *Oncotarget*, 9(20), 15350–15364.
- Mukaida, N. & Nakamoto, Y., 2018, Emergence of immunotherapy as a novel way to treat hepatocellular carcinoma, *WJG*, 24(17),1839-1858.
- Murakami, T., Mochizuki, K. & Nakamura, H., 2001, Imaging evaluation of the cirrhotic liver, *Seminars in Liver Dis.*, 21(2),213–224.

- Murakami, Y., Yasuda T., Saigo K., 2006, Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues., *Oncogene.*, 25, 2537–2545.
- Naffee, T.M., Farrell, W.E., Carroll, W.D., Eryer, A.A. & İsmail, K.M., 2008, Epigenetic control of fetal gene expression, *BJOG.*, 115(2),158-168.
- Niendorf, E., Spilseth, B., Wang, X. & Taylor, A., 2015, Contrast Enhanced MRI in the Diagnosis of HCC, *Diagnostics (Basel).*, 5(3),383-398.
- Obuz, F., 2015, Hepatoselular Karsinomda Radyolojik Tanı ve Evreleme, *TRD.*, 3, 437-460.
- Oliver, J.H., Baron, R.L., Federle, M.P. & Rockette, H.E., 1996, Detecting Hepatocellular Carcinoma: Value of Unenhanced or Arterial Phase CT Imaging or Both Used in Conjunction with Conventional Portal Venous Phase Contrast-Enhanced CT Imaging, *AJR.*, 167,71-77.
- Orenbuch-Harroch, E., Levy, L. & Ben-Chetrit, E., 2008, Acute hepatitis B or exacerbation of chronic hepatitis B-that is the question, *WJG.*, 14(46), 7133-7137.
- Özdemir, F.T., Tiftikci, A., Sancak, S., Eren, F., Tahan, V., Akın, H., Gündüz, F., Kedrah, A.E., Ustündağ, Y., Avşar, E., Tözün, N. & Özdoğan, O., 2010, The prevalence of the mutation in codon 249 of the P53 gene in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) in Turkey, *J Gastrointest Cancer.*, 41(3),185-189.
- Özkan, H., 2018, Epidemiology of Chronic Hepatitis B in Turkey, *Euroasian J. Hepatogastroenterol*, 8(1), 73-74.
- Pai-dhungat, J. V & Parikh, F.,2015, Baruch Blumberg : Discoverer of Hepatitis B Virus, *J Assoc Physicians India*, 63 (4), 89.
- Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H. & Karin, M., 2010, Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression, *Cell.*, 140(2),197-208.
- Park, Y.N. & Kim, M.J., 2011, Hepatocarcinogenesis: imaging-pathologic correlation, *Abdom Imaging.*, 36(3), 232-243.
- Parkin, D.M., 2006, The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002, *Int J Cancer.*, 118(12), 3030-3044.
- Pateron, D., Ganne, N., Trinchet, J.C., Aurousseau, M.H., Mal, F., Meicler, C., Coderc, E., Reboullet, P. & Beaugrand, M., 1994, Prospective study of screening for hepatocellular carcinoma in Caucasian patients with cirrhosis, *J Hepatol.*, 20(1),65-71.
- Peltier, H.J. & Latham, G.J., 2008, Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues , *CSH protocols.*, 14,844–852.
- Peng, Y. & Croce, C.M., 2016, The role of MicroRNAs in human cancer, *Signal Transduct Target Ther.*, 1(1),1-9.
- Pepe, F., Visone, R. & Veronese, A., 2018, The Glucose-Regulated MiR-483-3p Influences Key Signaling Pathways in Cancer, *Cancers (Basel).*, 10(6), 1-16.
- Pez, F., Lopez, A., Kim, M., Wands, J.R., Caron, F.C & Merle, P., 2013, Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs, *J Hepatol.*,59(5),1107-1117.

- Pfaffl, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, 29(9),1-6.
- Pineau P., Volinia S., Mcjunkin K., 2010, miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis., *Proc. Natl Acad. Sci.*, USA 107,264–269.
- Pogribny, I.P. & Rusyn, I., 2014, Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma, *Cancer Lett.*, 342(2), 223-230.
- Polesel, J., Zucchetto, A., Montella, M., Dal Maso, L., Crispo, A., La Vecchia, C., Serraino, D., Franceschi, S. & Talamini, R., 2009, *Ann Oncol.*, 20(2),353-357.
- Pollicino, T., Squadrito, G., Cerenzia, G., Cacciola, I., Raffa, G., Craxi, A., Farinati, F., Missale, G., Smedile, A., Tiribelli, C., Villa, E. & Raimondo, G., 2004, Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection, *Gastroenterology.*, 126(1),102-110.
- Rashad, N. M., El-Shal, A.S., Shalaby, S.M., Mohamed, S.Y., 2018, Serum miRNA-27a and miRNA-18b as potential predictive biomarkers of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma, *Mol. Cel. Biochem.*, 447(1-2), 1–12.
- Raza, A. & Sood, G.K., 2014, Hepatocellular carcinoma review: Current treatment, and evidence-based medicine, *WJG.*, 20(15),4115-4127.
- Ringehan, M., McKeating, J.A. & Protzer, U., 2017, Viral hepatitis and liver cancer, *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 372, 1-11.
- Roberts, G.G., 2016, Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma, *Gastroenterology & Hepatology*, 12(4), 252-255.
- Rosen, S., 2015, The World Market for Molecular Diagnostics, 6th ed., Kalorama, USA, Pub ID: KLI5695907.
- Rosenfeld, N., Aharonov, R., Meiri, E., Rosenwald, S., Spector, Y., Zepeniuk, M., Benjamin, H., Shabes, N., Tabak, S., Levy, A., Lebanony, D., Goren, Y., Silberschein, E., Targan, N., Ben-Aril, A., Gilad, S., Sion-Vardy, N., Tobar, A., Feinmesser, M., Kharenko, O., Nativ, O., Nass, D., Perelman, M., Yosepovich, A., Shalmon, B., Polak-Charcon, S., Fridman, E., Avniel, A., Bentwich, I., Bentwich, Z., Cohen, D., Chajut, A. and Barshack, I., 2008, MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin, *Nat. Biotechnol.*, 26(4), 462–469.
- Roskams, T. & Kojiro, M., 2010, Pathology of early hepatocellular carcinoma: conventional and molecular diagnosis, *Semin Liver Dis.*, 30(1), 17-25.
- Ross, R.K., Yuan, J.M., Yu, M.C., Wogan, G.N., Qian, G.S., Tu, J.T., Groopman, J.D., Gao, Y.T. & Henderson, B.E., 1992, Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma, *Lancet.*, 339(8799), 943-946.
- Röcken, C. & Carl-McGrath, S., 2001, Pathology and pathogenesis of hepatocellular carcinoma, *Dig Dis*, 19(4), 269-278.
- Sassen, S., Miska, E.A. & Caldas, C., 2008, MicroRNA: implications for cancer, *Virchows Arch.*, 452(1):1-10.
- Satyanarayana, A., Manns, M. P. and Rudolph, K. L. (2004) ‘SCIENCE FRONTIER Telomeres and Telomerase: a Dual Role in Hepatocarcinogenesis’. doi: 10.1002/hep.20308.

- Schmidt, J., Blum, H.E. & Thimme, R., 2013, T-cell responses in hepatitis B and C virus infection: similarities and differences, *Emerg Microbes Infect.*, 2(3),1-8.
- Seeger, C., Mason W., 2000, Hepatitis B Virus Biology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64 (1),51-68.
- Segura,M.F., Belitskaya-Lévy, I., Rose, A.E., Zakrzewski, J., Gaziel, A., Hanniford, D., Darvishian, F., Berman, R., Shapiro, R., Pavlick, A., Osman, I., & Hernando, E., 2015, Melanoma microRNA signature predicts post-recurrence survival, *Clin Cancer Res.*, 16(5), 1577-1586.
- Setshedi, M., Wands, J.R. & Monte, S.M., 2010, Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease, *Oxid Med Cell Longev.*, 3(3),178-185.
- Severi, T., van Malenstein, H., Verslype, C. & van Pelt, J.F., 2010, Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets, *Acta Pharmacol Sin.*,31(11), 1409-1420.
- Sherman, M., Peltekian, K. M. & Lee, C., 1995, Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: Incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population, *Hepatology.*, 22(2),432–438.
- Thomas, T., Budzinska, M.A., Shackel, N.A. & Urban, S., 2017, HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications, *Viruses.*, 9(4),1-18.
- Thorgeirsson, S.S. & Grisham, J.W., 2002, Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma, *Nat Genet.*, 31(4), 339-346.
- Tong, S., Kim, K.H., Chante, C., 2005, Wands, J., Jisu, L., Hepatitis B virus e antigen variants., *Int J Med Sci*,2(1): 2-7.
- Tornesello, M.L., Buonaguro, L., Tatangelo, F., Botti, G., Izzo, F. & Buonaguro, F.M., 2013, Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections, *Genomics.*, 102(2),74-83.
- Turati, F., Galeone, C., Rota, M., Pelucchi, C., Negri, E., Bagnardi, V., Corrao, G., Boffetta, P. & La Vecchia, C., 2014, Alcohol and liver cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies, *Ann. Oncol.*, 25(8), 1526-1535.
- Tüzün, S., Mikail, C., Savaş, O.A. & Tatar, C., 1999, Hepatocellular Carcinoma-Liver Resections, *Haseki Tıp Bülteni*, 1-9.
- Uren, R.T. & Turnley, A.M., 2014, Regulation of neurotrophin receptor (Trk) signaling: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) is a new player, *Front. Mol. Neurosci.*, 7(39), 1-14.
- Venkatakrishnan, B. *et al.* (2017) ‘HHS Public Access’, 3(1), pp. 429–451. doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042238.The.
- Venook, A. P., Papandreou, C., Furuse, J. ad Guevara, L.L., 2010, The Incidence and Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: AGlobal and Regional Perspective, *Oncologist.*, 15(4), 5–13.
- Villanueva, A., Newell, P., Chiang, D.Y., Friedman, S.L. & Llovet, J.M., 2007, Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma, *Semin. Liver Dis.*, 27(1), 55-76.

- Voytas, D., 1998, Agarose Gel Electrophoresis, *Curr. Protoc. Protein Sci.*, A4F1-A4F3.
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T. & Kim, Y.Y., 2010, MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials, *Biochim Biophys Acta.*, 1803(11), 1231-1243.
- Waidmann, O., Bihrer, V., Pleli, T., Farnik, H., Berger, A., Zeuzem, S., Kronenberger, B. & Piiper, A., 2012, Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection, *J. Viral Hepat.*, 19(2), 58-65.
- Wang, D., Wang, H., Li, Y. and Li, Q., 2018, MiR-362-3p functions as a tumor suppressor through targeting MCM5 in cervical adenocarcinoma, *Biosci. Rep.*, 38(3), 1-9.
- Wang Y., Lee, A.T., Ma, J.Z., 2008, Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224-up-regulation and apoptosis inhibitor-5-as a microRNA-224-specific target, *J. Biol. Chem.*, 283(19), 13205-13215.
- Wang, Y., Toh, H.C., Chow, P., Chung, A.Y., Meyers, D.J., Cole, P.A., Ooi, L.L. & Lee, C.G., 2012, MicroRNA-224 is up-regulated in hepatocellular carcinoma through epigenetic mechanisms, *FASEB J.*, 26(7), 3032-3041.
- Wang, J., Zhang, K.Y., Liu, S.M. & Sen, S., 2014, Tumor-associated circulating MicroRNAs as biomarkers of cancer, *Molecules.*, 19, 1912-1938.
- Wang, J., Chen, J. & Sen, S., 2015, MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics, *J. Cel. Physiol.*, 232(1), 25-30.
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R.M., Bhutta, Z.A., Carter, A. & Coates, M.M., 2016, Global, regional and national life expectancy, all-cause mortality, all-cause mortality and cause-specific mortality for 249 causes of death, *Lancet.*, 388, 1459-1544.
- Wang, J. & Sen, S., 2011, MicroRNA functional network in pancreatic cancer: From biology to biomarkers of disease, *J. Biosci.*, 36(3), 481-491.
- Weitz, I.C. & Liebman, H.A., 1993, Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: a critical review, *Hepatology.*, 18(4), 990-997.
- Won, C., Kim, B.H., Yi, E.H., Choi, K.J., Kim, E.K., Jeong, J.M., Lee, J.H., Jang, J.J., Yoon, J.H., Jeong, W.I., Park, I.C., Kim, T.W., Bae, S.S., Factor, V.M., Ma, S., Thorgeirsson, S.S., Lee, Y.H. & Ye, S.K., 2015, Signal transducer and activator of transcription 3-mediated CD133 up-regulation contributes to promotion of hepatocellular carcinoma, *Hepatology.*, 62(4), 1160-1173.
- Wong, M. C. S., Jiang, J.Y., Goggins, W.B., Liang, M., Fang, Y., Fung, F.D.H., Leung, C., Wang, H.H.X., Wong, G.L.H., Wong, V.W.S. & Chan, H.L.Y., 2017, International incidence and mortality trends of liver cancer : a global profile, *Nature.*, 7, 1-9.
- Wood, L.D., Heaphy, C.M., Daniel, H.D., Naini, B.V., Lassman, C.R., Arroyo, M.R., Kamel, I.R., Cosgrove, D.P., Boitnott, J.K., Meeker, A.K. & Torbenson, M.S., 2013, Chromophobe hepatocellular carcinoma with abrupt anaplasia: a proposal for a new subtype of hepatocellular carcinoma with unique morphological and molecular features, *Mod. Pathol.*, 26(12), 1586-1593.
- Wu, W., Wang, W.Y. , Yao, W.Q. & Li G.D., 2015, Suppressive effects of microRNA-16 on the proliferation, invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells, *Int J Mol Med.*, 36, 1713-1719.

- Wu, X., Yang, Y., Huang, Y., Chen, Y., Wang, T., Wu, S., Tong, L., Wang, Y., Lin, L., Hao, M., Zhong, Z.H., Zhang, F. & Zhao, W., 2018, RNA-binding protein AUF1 suppresses miR-122 biogenesis by down-regulating Dicer1 in hepatocellular carcinoma, *Oncotarget.*, 9(19), 14815-14827.
- Wursthorn, K., Wedemeyer, H., Manns, P., 2010, Managing HBV in patients with impaired immunity, *BMJ Journals*, 59, 1430-1445.
- Xu, J., Wu, C., Che, X., Wang, L., Yu, D., Zhang, T., Huang, L., Li, H., Tan, W., Wang, C., & Lin, D., 2011, Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis, *Mol Carcinog.*, 50(2), 136-42.
- Yapali, S., Talaat, N. & Lok, A.S., 2014, Management of hepatitis B: our practice and how it relates to the guidelines, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 12(1), 16-26.
- Yates, S. O. L. *et al.* (2001) 'Quantitative Detection of Hepatitis B Virus DNA by Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification with Molecular Beacon Detection', 39(10), pp. 3656–3665. doi: 10.1128/JCM.39.10.3656.
- Yang, J.D., Kim, W.R., Coelho, R., Mettler, T.A., Benson, J.T., Sanderson, S.O., Therneau, T.M., Kim, B. & Roberts, L.R., 2011, Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 9(1), 64-70.
- Yen, T.S.B., 1996, Hepadnaviral X protein: Review of recent progress, *J. Biomed Sci* , 3:20-30
- Yoon, S.K., 2012, The Biology of Cancer Stem Cells and Its Clinical Implication in Hepatocellular Carcinoma, *Gut Liver*, 6(1), 29-40.
- Zhang, Z.Z., Liu, X., Wang, D.Q., Teng, M.K., Niu, L.W., Huang, A.L. & Liang, Z., 2011, Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma at the miRNA level, *WJG.*, 17(28), 3353–3358.
- Zhang, B., Han, S., Feng, B., Chu, X., Chen, L. and Wang, R., 2016, Hepatitis B virus X protein-mediated non-coding RNA aberrations in the development of human hepatocellular carcinoma, *Exp. Mol. Med.*, 49, 1-12.
- Zhang, H., Li, T., Zheng, L. and Huang, X., 2017, Biomarker MicroRNAs for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Identified Based on Gene Expression Data and MicroRNA-mRNA Network Analysis, *Comput. Math. Methods Med.*, 1-8.
- Zhou, S.L., Hu, Z.Q., Zhou, Z.J., Dai, Z., Wang, Z., Cao, Y., Fan, J., Huang, X.W. and Zhou, J., 2016, miR-28-5p-IL-34-Macrophage Feedback Loop Modulates Hepatocellular Carcinoma Metastasis, *Hepatology.*, 3(5), 1560-1575.
- Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.C. & Llovet, J.M., 2015, Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma, *Gastroenterology.*, 149(5), 1226-1239.

EKLER



KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMA ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Birimi Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ
TELEFON	0262 303 71 64
FAKS	0262 303 74 63
E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kronik Hepatit B tedavisinde oral antiviral kullanımının hepatosellüler karsinom progresyonuna etkisi		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	KAEK 2012/67		
	EUDRACT NUMARASI			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Dr.Seda E.Basmaz		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Gastroenteroloji BD		
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Sadettin Hülagü(Danışman), Doç.Dr.Murat Sayan, Prof.Dr.Yeşim Gürbüz		
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	Gastroenteroloji BD		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	KOU Tıp Fak.İç Hast.Gastroenteroloji BD		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Umuttepe Yerleşkesi Üçtepeler/İZMİR		
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐	
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐	FAZ 2 ☐	FAZ 3 ☐
		FAZ 4 ☐	BE/BY ☐	DİĞER ☐
	İLAC ☐	DİŞİ ☐	ARAŞTIRMA ☐	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	16.03.2012		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	16.03.2012		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	KOU Bilimsel Araştırmalar Fonu
	SİGORTA	☐	-
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	-
	İLAN	☐	-
	YILLIK BİLDİRİM	☐	-
	SONUÇ RAPORU	☐	-
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	-

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 6/6	Tarih: 20.03.2012	Proje no: KAEK 2012/67
	Dr. Seda E. Basmaz'ın Uzmanlık tez başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve Kurulumuz kararının başvuru sahibi tarafından Sağlık Bakanlığı'na arzına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

LİŞMA ESASI

Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420), Helsinki Bildirgesi (2008), İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu (10 Aralık 2010), ICH/GCP-Guideline for Good Clinical Practice (10 Haziran 1996) İnsan Denekleri İçeren Biyomedikal Araştırmaların Uluslararası Rehber Kuralları (CIOMS, 2002), Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (10 Mart 2011/6212), Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi: İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesi (4 Nisan 1997), Ek Madde -10 (6 Nisan 2011, 6225)

K KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: KOÜ TF Tıp Tarihi ve Etik AD./PROF. DR. NERMİN ERSOY
ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
f. Dr. Nermin ERSOY	Deontoloji	KOÜ TF Tıp Tarihi ve Etik AD.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	N. Ersoy
f. Dr. Dilek URAL	Kardiyoloji	KOÜ TF Kardiyoloji AD.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	D. Ural
f. Dr. B. Faruk ERDEN	Farmakoloji	KOÜ TF Farmakoloji AD.	E	E ☐ H ☐	E ☒ H ☐	B. Erden
f. Dr. Yeşim GÜRBÜZ	Patoloji	KOÜ TF Patoloji AD.	K	E ☒ H ☐	E ☐ H ☐	Y. Gürbüz
f. Dr. Gülcan TÜRKER	Pediyatri	KOÜ TF Çocuk Sağlığı ve Hast. AD.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	G. Türker
f. Dr. Berna Ayakta ŞERİFİ	Halk Sağlığı	İzmit 1 Nolu AÇSAP	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	B. Şerifi
f. Doç. Dr. Ayşe KARSON	Fizyoloji	KOÜ TF Fizyoloji AD.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	A. Karson
Dr. Hale MARAL KIR	Biokimya	KOÜ TF Biokimya AD.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	H. Maral Kır
Dr. Yunus Oktay ATALAY	Anestezi ve reanimasyon	Kocaeli Seka Devlet Hast.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Y. Oktay
Dr. Murat GÜVEN	Genel cerrahi	Kocaeli Derince Eğt. Arş Hastanesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Güven
Dr. Sayın IŞIK	Avukat	Kocaeli Barosu	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	S. Işık
Dr. Tırka	Hasta Hakları Temsilcisi	Emekli	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	T. Tırka

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

08.04.2014

İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne,

Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu'ndan 20.03.2012 tarihli 'Kronik Hepatit B tedavisinde oral antiviral kullanımının hepatosellüler karsinom progresyonuna etkisi' isimli KAEK 2012/67 proje, 6/6 karar no'lu etik kurul kapsamında alınan örnekler için Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu'nda hastaların ileri tarihli çalışmalar için de izin verdiklerini beyan ederim.

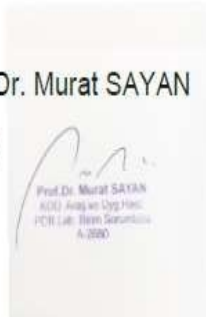
Tez yürütücüsü Recep Demirgan'a bu numuneler, seçilen mikroRNA'ların belirteç olarak kullanılabilirliğini araştırması için 'Hepatit B Virüsü ile Infekte Hepatoselular Karsinoma Tanısı Konulmuş Hastalarda Belirteç Olarak MikroRNA'ların Değerlendirilmesi' başlıklı doktora tezinde kullanılması amacıyla verilmiştir.

Bilgilerinize sunulur.

Saygılarımla,

Prof. Dr. Murat SAYAN

İmza:



Prof. Dr. Murat SAYAN
KOCaeli Üniversitesi
PCR Lab. Başan Sorumlu
A-3580

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Recep Demirgan
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	15.05.1982
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0535 625 24 92
E-Posta Adresi	recep_demirgan@yahoo.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2004

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler
Yücel, F., Akçael, E., Demirgan, R., Yeşilbağ, K., 2007, MAbs Against Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), <i>Hybridoma</i> , 28(5):383-384.
Karagöz, A., Kara, T.N., Çakır, Ö., Demirgan, R., Arı, Ş., 2007, Cytotoxic Activity of Crude Extracts From Astragalus Chrysochlorus (Leguminosae), <i>Biotechnol. & Biotechnol. Eq.</i> , 220-222.
Demirgan, R., Karagöz, A., Pekmez, M., Uçar, E.Ö., Artun, F.T., Gürer, Ç., Mat, A., 2016, In Vitro Anticancer Activity and Cytotoxicity of Some Papaver Alkaloids on Cancer and Normal Cell Lines, <i>Afr J. Tradit Complemetn Altern. Med</i> , 13(3), 22-26.

Demirgan, S., Akyol, O., Temel, Z., Şengelen, A., Pekmez, M., Demirgan, R., Sevdı, M.S., Erkalp, K., Selcan A., 2019, Isoflurane exposure in infant rats acutely increases aquaporin 4 and does not cause neurocognitive impairment, *Bosn J Basic Med Sci*, 1-27.

