

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ VİROLOJİ BİLİM DALI

**VİRAL HEPATİT B İLE İLİŞKİLİ SİROTİK HASTALARDA miR-142-5P VE
miR-130A-3P'NİN PREDİKTİF DEĞERİ**

UZM. DR. N. BEGÜM SARAN GÜLCEN

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2017

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ VİROLOJİ BİLİM DALI

**VİRAL HEPATİT B İLE İLİŞKİLİ SİROTİK HASTALARDA miR-142-5P VE
miR-130A-3P'NİN PREDİKTİF DEĞERİ**

UZM. DR. N. BEGÜM SARAN GÜLCEN

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Danışman: DOÇ. DR. BAHADIR FEYZİOĞLU

KONYA, 2017

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen anabilim dalı başkanımız saygıdeğer Prof. Dr. Mahmut BAYKAN hocama, yandal asistanlığım süresince her konuda bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, hiçbir konuda yardımını esirgemeyen çok değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU'na, birçok konuda desteklerini aldığım Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR, Doç. Dr. Metin DOĞAN ve Yrd. Doç. Dr. Fatma Esenkaya Taşbent'e, istatistiksel değerlendirmede yardımlarını gördüğüm Sayın Sinan İyisoy'a, tezimi 161518017 no'lu proje ile destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü yöneticilerine, paylaşımlarıyla her zaman bana destek olan asistan arkadaşlarıma, tüm mikrobiyoloji laboratuvarı teknisyen ve personeline en içten dileklerle teşekkür ederim.

Haziran 2017

Uzm. Dr. N. Begüm Saran Gülcen

ÖZET

VİRAL HEPATİT B İLE İLİŞKİLİ SİROTİK HASTALARDA miR -142-5P VE miR-130A-3P'NİN PREDİKTİF DEĞERİ

N. BEGÜM SARAN GÜLCEN

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

KONYA-2017

Amaç: Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalında 1.Ocak.2015 - 1.Aralık.2016 arasında kronik hepatit B tanısı alarak perkutan karaciğer biyopsisi yapılan toplam 92 hasta, hepatite bağlı fibroziste, tanı belirteçi ve tedavi hedefi olarak miR-142-5p ve miR-130a-3p miRNA'larının kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla çalışmaya alınmıştır.

Yöntem: Karaciğer biyopsileri modifiye İshak skoruna göre değerlendirilmiş; hastalar evreleri ile uyumlu şekilde grup 1-6 içerisinde sınıflandırılmıştır. Hastaların serum miR-142-5p and miR-130a-3p düzeyleri Real-time PCR metodu ile ölçülmüştür. Grup 1'de yer alan hastalar kontrol grubu olarak belirlenerek, gruplar arasındaki gen ekspresyon seviyeleri farkları $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Fibrozis evre 1'de 18 hasta, evre 2'de 28, evre 3'de 18, evre 4'de 10, evre 5'de 2 ve evre 6'da 16 hasta tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda miR-130a-3p ekspresyon miktarında artış; gruplar kendi aralarında kıyaslandığında grup düzeyi arttıkça ekspresyon miktarında lineer azalma izlenmiş, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). Grup 2'de kontrol grubuna göre miR-142-5p ekspresyon miktarında artış; grup 3,4,5 ve 6'da ise azalma izlenmiştir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Sonuç: HBV'ye bağlı fibrozisli hastalarda miR-130a-3p'nin belirli aralıklarla serumda ölçülerek yapılacak düzey takiplerinin, hastaların karaciğer fibrozis düzeyindeki değişim hakkında fikir verebileceği düşünülmüştür. miR-142-5p'nin kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda fibrozis varlığı için uyarıcı olabilmekle birlikte, evreleme için düzey ölçümlerinin faydalı olmayacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kronik hepatit B, fibrozis, miR-130a-3p, miR-142-5p

Bu çalışmayı Necmettin Erbakan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü 161518017 no'lu proje ile desteklemiştir.

ABSTRACT

PREDICTIVE VALUE OF miR-142-5P AND miR-130A-3P AS A POTENTIAL BIOMARKER FOR LIVER CIRRHOSIS ASSOCIATED WITH VIRAL HEPATITIS B

N. BEGÜM SARAN GÜLCEN

KONYA-2017

Objective: A total of 92 patients diagnosed with chronic hepatitis B infection and underwent percutaneous liver biopsy between January 1, 2015 and December 1, 2016 at Necmettin Erbakan University Meram Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology were investigated in order to determine the usability of miR-142-5p and miR-130a-3p as diagnostic marker and therapeutic target for HBV related fibrosis.

Method: Liver biopsies were scored using modified Ishak method, patients were classified in groups 1-6 in accordance with fibrosis stages. Serum levels of miR-142-5p and miR-130a-3p were detected by Real-time PCR. Patients in group 1 were chosen as control group and difference in expression levels between groups were compared by using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Results: Eighteen patients were found in fibrosis stage 1, 28 in stage 2, 18 in stage 3, 10 in stage 4, 2 in stage 5 and 16 in stage 6. When compared with the control group, increased expression of miR-130a-3p is observed in all groups; when the groups were compared to each other, the amount of expression decreased linearly as the group level increased, and this decrease was found to be statistically significant ($p < 0.0001$). When compared to control group; increased expression of miR-142-5p in group 2 and decreased expression in group 3, 4, 5 was observed. The difference between the groups was not found to be statistically significant ($p > 0.05$).

Conclusion: In patients with HBV related fibrosis, measuring miR-130a-3p levels in serum at certain time intervals may provide insight into changes in patients' liver fibrosis stages. While miR-142-5p may indicate for fibrosis in patients with chronic hepatitis B infection, measuring levels for evaluating stages may not be beneficial.

Key Words: Chronic hepatitis B, fibrosis, miR-130a-3p, miR-142-5p

This project is supported by Necmettin Erbakan University, Scientific Research Project Coordinator. Project no: 161518017

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tarihçe	3
2.2 Hepatit B virüsü	3
2.2.1 Genom Yapısı	3
2.2.2 HBV genotipleri	4
2.2.3 Bulaş yolları	4
2.3 HBV enfeksiyonunun klinik seyri	5
2.3.1 Akut ve Kronik Hepatit	5
2.3.2 Siroz ve hepatoselüler karsinom (HCC)	6
2.4 Karaciğer fibrozisi	7
2.4.1 Karaciğer fibrozisinde histopatolojik inceleme	8
2.5 MikroRNA (miRNA)	9
2.5.1 MikroRNA biyosentezi	9
2.6 HBV miRNA ilişkisi	10
2.7 Fibrozis miRNA ilişkisi	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM	14
3.1 Hasta seçimi	14
3.2 Serum örnekleri	14
3.3 Fibrozis evrelemesi	14
3.4 miRNA izolasyonu	14
3.4.1 Primerler	15
3.4.2 cDNA sentezi	16
3.4.3 Real time PCR	17
3.4.3.1 Amplifikasyon	17
3.5 Sonuç değerlendirme ve istatistiksel analiz	18
3.6 Etik Kurul Onayı	18
4. BULGULAR	19
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	39
7. KAYNAKLAR	41

TABLULAR

Tablo 2.1. Histolojik aktivite indeksi evrelendirmesi

Tablo 3.1. PCR için kullanılan primerler

Tablo 3.2. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler

Tablo 3.3. PCR reaksiyonu döngüsü

Tablo 3.4. Real time PCR için reaksiyon miksi bileşenleri

Tablo 4.1. Grup 2 için mir-130a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Tablo 4.2. Grup 3 için mir-130a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Tablo 4.3. Grup 4 için mir-130a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Tablo 4.4. Grup 5 için mir-130a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Tablo 4.5. Grup 6 için mir-130a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Tablo 4.6. Grup 2 için mir-142-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Tablo 4.7. Grup 3 için mir-142-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Tablo 4.8. Grup 4 için mir-142-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Tablo 4.9. Grup 5 için mir-142-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Tablo 4.10. Grup 6 için mir-142-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Virüs genom yapısı

Şekil 2.2. Hipotez

Şekil 4.1. 2.grup örneklerinin hsa-mir-130a-3p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Şekil 4.2. 3.grup örneklerinin hsa-mir-130a-3p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Şekil 4.3. 4.grup örneklerinin hsa-mir-130a-3p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Şekil 4.4. 5.grup örneklerinin hsa-mir-130a-3p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Şekil 4.5. 6.grup örneklerinin hsa-mir-130a-3p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Şekil 4.6. 2.grup örneklerinin hsa-mir-142-5p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Şekil 4.7. 3.grup örneklerinin hsa-mir-142-5p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Şekil 4.8. 4.grup örneklerinin hsa-mir-142-5p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Şekil 4.9. 5.grup örneklerinin hsa-mir-142-5p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Şekil 4.10. 6.grup örneklerinin hsa-mir-142-5p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Şekil 5.1. Gruplardaki mir130a-3p ekspresyonunun referans RNA ile kıyaslanmış düzeyi

Şekil 5.2. Gruplardaki mir142-5p ekspresyonunun referans RNA ile kıyaslanmış düzeyi

Şekil 5.3. HBV, miR-130a, PGC1 ve PPAR γ etkileşimleri

Şekil 5.4. IL-4, miR-130a-3P, PPAR γ ve M2 etkileşimleri

KISALTMALAR VE SİMGELER

- ALP:** Alkalen fosfataz
ALT: Alanin aminotransferaz
AP-1: Activator protein 1
AST: Aspartat Aminotransferaz
CCL18: Chemokine (C-C motif) ligand 18
cDNA: Complementary DNA
CT: Threshold cycle
CTGF: Connective tissue growth factor
DNA: Deoksiribonükleik asit
ESM: Ekstraselüler matriks
GGT: Gama Glutamil Transferaz
HBcAg : Hepatit B core (kor) antijeni
HBeAg : Hepatit B envelope (zarf) antijeni
HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni
HBV: Hepatit B virüsü
HCC: Hepatosellüler karsinom
HCV: Hepatit C virüsü
HepG2: Liver hepatocellular cells
hsa-mir: İnsan miRNA'sı
HSC: Hepatik stellat hücreler
IFN- γ : Interferon- γ
IL-13: İnterlökin-13
IL-4: İnterlökin-4
KHB: Kronik hepatit B
M1: Makrofajlar 1
M2: Makrofajlar 2
MFAP: Microfibrillar-associated protein
MiRNA: MikroRNA
MMP: Matrix metalloproteinase
NFKB: Nuclear Factor kappa B
ORF: Open reading frames

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDGF: Platelet-derived growth factor

PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PIIINP: Amino terminal propeptide of type III procollagen

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ

RISC: RNA-induced silencing complex

RNA: Ribonükleik Asit

RT-PCR: Real time PCR, gerçek zamanlı polimeraz zincirleme tepkimesi

SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1

STAT6: Signal transducer and activator of transcription 6

TARBP2: Transactivation- responsive RNA-binding protein

TGF β : Transforming growth factor beta

Th1: T helper type 1

Th2: T helper type 2

TIMP-1: Metallopeptidase inhibitor 1

TNF: Tumor necrosis factor

UTR: Untranslated region

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

YKL-40: Tyrosine (Y), lysine (K) and leucine (L) apparent molecular weight of YKL-40

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hepatit B virüsü (HBV), Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmi çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Virüs ile karşılaşma sonrası 6 hafta ile 6 ay arasında değişen bir inkübasyon periyodundan sonra şiddeti değişken klinik bulgularla akut enfeksiyona sebep olmakta; iyileşme 6 ay içerisinde beklenmektedir. HBsAg pozitifliğinin 6 aydan daha uzun süre devam etmesi kronik enfeksiyon olarak kabul edilir. Dünyada 240 milyon kişi kronik hepatit B (KHB) tanısına sahiptir. Erişkin yaşlardaki enfekte hastalarda %5-10 kronikleşme oranı görülmekte olup, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre kronik enfekte hastaların %20–30’unda siroz ve/veya karaciğer kanseri gelişmekte, her yıl 650.000’den fazla kişi karaciğer yetmezliği, siroz ve özellikle hepatosellüler karsinom (HCC) gibi hepatit B komplikasyonları nedeniyle yaşamlarını kaybetmektedir (WHO 2017, Ağca 2015). HBV enfeksiyonu ülkemizde de en önemli sağlık sorunlarından biridir. Ülkemizde yaklaşık 3–4 milyon insanın bu virüsü taşıdığı tahmin edilmektedir (Coşkun ve ark 2012). Karaciğer kanseri olguları incelendiğinde; hastaların % 82’sinde viral etyoloji görülmekte, bunların da üçte ikisini hepatit B oluşturmaktadır (Doğan 2007).

Karaciğer fibrozisi, normal doku mimarisinin ilerleyen yıkımı veya fibröz doku ile hepatosit dokusunun yer değiştirilmesine yol açan kronik viral hepatitin sık görülen bir komplikasyonudur. Fibrozis sürecinde birçok hücre tipi ve değişik faktörler rol oynamaktadırlar; hem ekstrasellüler matriksin kendisi hem de aktive olmuş hücrelerin salgıladığı sitokinler aracılığı ile meydana gelen bir dizi olay ekstrasellüler matriks yapımında artış ve içeriğinde değişime yol açar (Friedman 2004).

MikroRNA (miRNA), bitkiler, hayvanlar ve bazı virüslerde bulunan, RNA susturma ve gen anlatımının post transkripsiyonel düzenlenmesinde işlev gören yaklaşık 22 nükleotitden oluşan küçük protein kodlamayan (non-coding) RNA molekülüdür. HBV ile miRNA arasındaki ilişkilerin aydınlatılması enfeksiyonun moleküler düzeyde patogenezinin anlaşılması ile ve aşamalarının ortaya konması ile ivme kazanmıştır. Birçok miRNA’nın HBV üzerinde inhibe edici ve/veya HBV replikasyonunu artırıcı etkisi gösterilmiştir.

Fibrozis sürecinde yer alan makrofajlar, anahtar immün hücrelerdir ve kollajen üreten myofibroblastlarla yakın ilişki içindedir. İnterlökin-4 (IL-4) ve interlökin-13 (IL-13) ile indüklenen makrofajlar profibrojenik sitokinlerin salınımına neden olarak fibroblastları aktive eder. Fare modellerinde makrofajlardan transforming growth factor

beta (TGF β) sekresyonunun engellenmesi ile karaciğer fibrozisinin inhibe edildiği gösterilmiştir. IL-4 / IL-13'ün hedefi olan sitokin sinyalinin sũpresũrũ 1 (Suppressor of cytokine signaling 1; SOCS1) ve peroksizom proliferatũr ile aktive olan reseptũr γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PPAR γ)'nin uyarılmasıyla kronik enflamasyonda makrofajların profibrogenezisini dũzenlediđi kũltũre edilmiş makrofajlar ve farelerde yapılan çalışmalar ile rapor edilmiştir. Bu yolakta miR-142-5p ve miR-130a-3p'nin regũlasyonda önemli rol oynadığı ortaya konmuştur (Su ve ark 2015).

Biz alışmamızda, viral hepatite bağlı fibrozis tanı belirteçi ve tedavi hedefi olarak miR-142-5p ve miR-130a-3p miRNA'ların kullanılabilirliğini araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda, fibrozis skoru belirlenmiş ve kategorize edilmiş viral hepatitli hastaların serum örneklerinde bu miRNA'ları inceleyeceğiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

HBV ilk defa 1965 yılında serum proteinlerinde kalıtsal polimorfizmi araştıran Blumberg ve arkadaşları tarafından “Avustralya Antijeni” adı verilen bir serum proteini olarak rapor edilmiştir. 1970 yılında tüm virionun elektron mikroskopik incelemelerinde üç değişik partiküle rastlanmışlardır. Bunlardan enfektif özelliğe sahip, 42 nm çapında olanlara “Dane partikülü” adı verilmiştir. Dane partikülleri dışında 22 nm’lik sferik ve 22 x 100-200 nm büyüklüğünde filamentöz partiküller de elektronmikroskopunda tarif edilmiş, sonraki yıllarda çeşitli çalışmalar ile virusun genomik yapısı ve proteinleri tanımlanmıştır (Purcell 1993, Ustaçelebi ve Ergünay K 2007).

2.2 Hepatit B virüsü

HBV Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı vardır. Hepatotrop bir virüs olup sebebiyet verdiği immunreaksiyon nedeniyle karaciğer hücre hasarı yapar Karaciğer kanseri geliştirme riski nedeniyle onkojenik virüs olarak adlandırılır (Taş 2009).

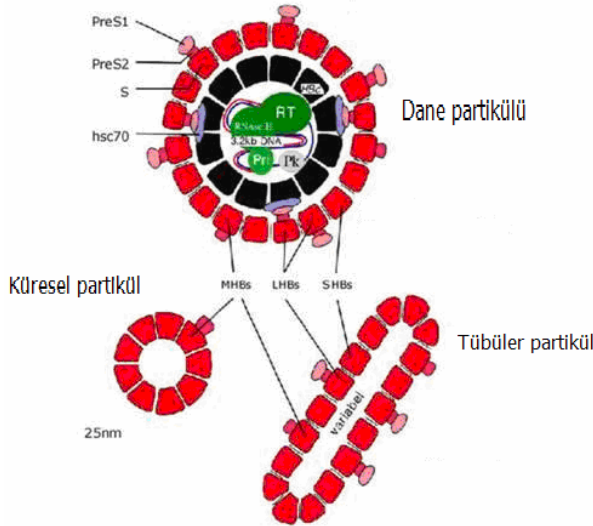
HBsAg içeren serum örneklerinde yaklaşık 42 nm (42-47 nm) çapında, enfektif özellikte, tam bir viryon yapısında, küresel şekilli Dane partikülleri ve yaklaşık 22 nm (16-25 nm) çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, non enfektif küresel ve tübüler partiküller bulunur. Bu partiküller immünojenik olup Anti-HBs antikorları ile reaksiyon verirler. Dane partiküllerinin sayısı serumda diğerlerine göre her zaman daha azdır. Yapısında viral genomu çevreleyen ikozohedral kapsid ve küçük (small,S), orta (middle,M), büyük (large,L) glikoprotein taşıyan lipoprotein yapıları bir zarf yer alır (Taş 2009, İnan 2015).

2.2.1 Genom Yapısı

Viral DNA üst üste çakışan (overlapping) S, C, P ve X açık gen okuma bölgelerini (ORF; open reading frames) içermektedir. Viral genom bu özelliği ile %150 yararlılıkta kullanılabilir (İnan 2015).

4 ORF bölgesi ve kodladığı proteinler:

1. **Prekor/kor geni** (nükleokapsid proteini kodlar; HBcAg ve yapısal olmayan salgılanan protein; HBeAg)
2. **Polimeraz geni** (reverse transkriptaz, RNAaz H ve terminal protein domainleri)
3. **preS1/PreS1 ve S geni** (L, M ve S olmak üzere zarf proteinlerini kodlar)
4. **X geni** (küçük regülatör X proteinini kodlar)



Şekil 2.1. Virüs genom yapısı

2.2.2 HBV Genotipleri

Dünyada en az 9 HBV genotipi (A-I) vardır. HBV prevalansının düşük olduğu Kuzeybatı Avrupa ve A.B.D.'deki persistan taşıyıcılarda genotip A baskındır. Amazon bölgesi ve Peru gibi yüksek HBV prevalansına sahip ülkelerde ise genotip F'nin sık olduğu görülmüştür. Doğu Asya ülkelerinde genotip B ve C'nin prevalansı yüksektir. Akdeniz ve Sahra altı Afrika ülkelerinde genotip A ve D baskın olan tiptir. Genom sekansları arasında %8'in üzerinde fark olduğu genotip C ve F ile enfekte hastalarda genotip B ve D'ye kıyasla HCC'in daha yüksek oranda görüldüğü belirlenmiştir (Arauz-Ruiz ve ark 1997, Moraes ve ark 1996, WHO 2017).

2.2.3 Bulaş yolları

Tanımlanmış olan olası hepatit B virüsü bulaş yolları; anneden bebeğe doğum esnasında geçiş, seksüel temas, intravenöz ilaç kullanımı ve kan transfüzyonları sırasında meydana gelen geçişlerdir. Oral yolla bulaşma ancak enfekte kanın hasarlanmış oral mukozaya temasıyla gerçekleşebilir. Göz ve bütünlüğü bozulmuş deri de virusun geçişi yolları

arasındadır. HBeAg pozitif hastalardaki viral yük daha yüksek olduğundan bu hastalardan bulaş genel olarak daha yüksek oranda görülmektedir. HBeAg pozitif bir hastanın iğnesinin batması ile olan yaralanmalarda bulaş oranı %30-62 iken, HBeAg negatif hastadan bu oran %6-37'dir. Perinatal bulaş değerlendirildiğinde bebekte maruziyet sonrası immün koruma yapılmadığında, HBeAg pozitif anneden doğan bebeklerde, ilk 6 ayda %70-90 KHB gelişme riski varken; bu oran HBeAg negatif anneden doğan bebeklerde %10'dan azdır (Robinson 1995, Doğan 2007, Güçlü ve Geyik 2012, EMI Guidelines 2016).

2.3 HBV enfeksiyonunun klinik seyri

2.3.1 Akut ve Kronik Hepatit

Akut hepatit B enfeksiyonu, asemptomatik enfeksiyondan kendini sınırlayan hepatit veya fulminan hepatite kadar geniş bir spektrumda ortaya çıkabilir. Erişkinlikte HBV ile enfekte olanlarda semptomatik hepatit hastaların %5-20' inde görülür. Yenidoğan ve erken bebekte geçirilen enfeksiyonlar genellikle asemptomatiktir. Semptomatik hepatit 1-5 yaşları arasında %10 civarında görülürken yenidoğan döneminde bu oran %1'den azdır. Enfeksiyonun edinildiği yaş ile kronikleşme arasında ters bir ilişki vardır. En yüksek kronikleşme oranı yenidoğanlardadır (%90). Kronikleşme riski 1-5 yaşları arasında %20-30'a, erişkinlikte enfekte olan hastalarda %1-5'e düşer. Erişkin hastaların %95'inden fazlasında HBsAg'nin yok olması ve anti-HBs'nin saptanması ile birlikte iyileşme görülür (Kidd-Ljunggren ve Miyakawa 2002, EASL Jury 2003, Liaw ve Chu 2009).

Akut HBV enfeksiyonunun inkübasyon dönemi 4 - 28 hafta olup çoğu vakada bu süre 60 - 180 gündür. HBV ile enfekte olan erişkinlerde akut hepatit semptomları başta halsizlik ve yorgunluk olup bunu iştahsızlık, bulantı, kusma ve sağ üst kadranda hafif künt bir ağrı takip eder. Preikterik dönemdeki bu semptomlar genellikle 3 - 10 gün sürer. Bu dönemi takip eden yüksek düzey transaminaz ve bilirubin ile karakterize sarılığın süresi genellikle 1 - 3 haftadır, nadiren 4 haftayı aşar. Çocuklar genellikle 2 haftada, erişkinler ise 4 - 6 haftada iyileşir. Fulminan tablo akut HBV hepatitli olguların %1-2'sinde oluşabilir ve %63-93 oranda fatal seyirlidir (Robinson 2000).

HBsAg'nin serumda altı aydan uzun süre saptanması durumunda kronik enfeksiyondan söz edilir. Kronik enfeksiyon tipik olarak immüntoleran faz, immünreaktif faz, inaktif faz, HBeAg negatif kronik aktif faz olmak üzere 4 fazdan oluşur. İnaktif döneme geçen hastaların büyük bölümü ömür boyu bu dönemde kalırken, bazı hastalarda

virüsün reaktivasyonu görülebilir. İmmuntoleran dönemi HBeAg pozitifliği, HBV DNA yüksekliği, normal ALT, normal karaciğer biyopsisi ile karakterizedir ve 10-30 yıl sürebilir. Sonrasında olasılıkla virüsün antijenik yapısındaki bazı değişiklikler nedeniyle sonlanır ve virüsle enfekte hepatositlere karşı konakta immün reaksiyon gelişmeye başlar. Bu dönemde HBV DNA düzeyi düşer, ALT düzeyi yükselir, karaciğer biyopsisinde kronik hepatit bulgularına rastlanır ve sıklıkla HBeAg serokonversiyonu görülür. HBeAg serokonversiyon oranı yaşlılarda, kadınlarda, ALT düzeyi yüksek olanlarda ve genotip B ile enfekte kişilerde (genotip C'ye göre) daha yüksektir.

HBSAg'nin pozitif saptandığı ancak klinik bulgunun olmadığı dönem inaktif taşıyıcılık dönemidir. Hepatositlerin immün reaksiyon sonucu büyük oranda temizlenmesi ve virüsün baskılanması nedeniyle kalıcı bir HBeAg negatifliği ve anti-HBe pozitifliği meydana gelir. Virüsün replikasyonu ve antijen ekspresyonu azalır. %20 - 30 olasılıkla HBV DNA'nın ve ALT'nin yükselmesi, bazen de HBeAg'nin yeniden pozitifleşmesi ile giden alevlenmeler görülebilir. Bu alevlenmeler sonrasında kronik hepatit gelişebilir.

HBeAg serokonversiyonu sonrasında bazı hastalarda replikasyonun devam etmesi durumunda HBeAg negatif kronik hepatitten bahsedilir. Hastalarda HBSAg(+), HbeAg(-), en az bir yıl boyunca anti-HBe(+) ve HBV DNA pozitifdir ($>10^{4-5}$ kopya/ml). Zaman zaman veya sürekli ALT yüksekliği görülür. HBeAg'nin sekresyonunu engelleyen mutasyonlardan dolayı HBeAg salınamaz ama replikasyon devam eder. Hastaların %50'den fazlasında orta-ağır nekroinflamasyon bulguları vardır. Kendiliğinden kalıcı remisyona girme olasılığı çok düşüktür. Hastalığın uzun dönem prognozu iyi değildir (Sonsuz. 2007, Şengönül 2008, Akhan ve ark 2014).

2.3.2 Siroz ve hepatoselüler karsinom (HCC)

Kronik hepatitli olgularda Hepatit B virüsünün replikasyonu ve gelişen immün yanıtla karaciğer dokusunun hasarlanması sonucu siroz ve/veya hepatoselüler karsinom oluşumu gerçekleşir. Diğer risk faktörleri erkek cinsiyet, ilerleyen yaş, sürekli HBeAg/DNA pozitifliği, sürekli ALT yüksekliği, HCV, HIV veya hepatit delta virüs ile koenfeksiyon, HBeAg'nin tekrar pozitifleşmesi, genotip C ile enfeksiyondur. Buna ek olarak HBV genotipi, alkol alımı, obezite, aflatoksin maruziyet, sigara kullanımı, ailede HCC hikayesi, pre-S, core-promoter mutasyonları HCC gelişimi için risk faktörleridir. HCC gelişme riski özellikle şiddetli ve dekompanse sirozlu hastalarda yüksektir. HBV ile enfekte bireylerde HCC riski enfekte olmamış popülasyona göre 15-20 kat yüksektir. HBV ile kronik enfekte olgularda HCC gelişme riski %10-25 olarak bildirilmiştir. HBV ile ilişkili

kanserlerin %70-90'ı siroza bağlı gelişir (Dhanasekaran ve ark 2012, Mittal ve El-Serag 2013).

2.4 Karaciğer fibrozisi

Karaciğer fibrozisi kronik hepatik hasar ve inflamasyon sonucu sekonder olarak gelişir. Fibrozis sebepleri olarak viral ve otoimmün hastalıklar, alkol, nonalkolik steatohepatit, bakır veya demir yüklenmesine neden olan metabolik hastalıklar, toksinler ve bilier obtrüksiyon sayılabilir (Kitano ve Bloomston 2016). Karaciğer dokusu hasarlandığında, bağışıklık sistemi hasarı onarmak için aktive edilir. Karaciğer fibrozisi tüm bireylerde aynı oranda oluşmaz; kronik hepatit C veya B'li hastalarda fibrozis bazen sabit kalır ya da zamanla gerileme olabilir. Normal doku mimarisinin ilerleyen yıkımına, fibröz doku ile hepatosit dokusunun yer değiştirmesine yol açan kronik viral hepatitin sık görülen bir komplikasyonu olan karaciğer fibrozisi, kronik viral hepatit morbidite ve mortalitesinin en önemli nedenidir (Friedman 2004).

Fibrozis sürecinde biręok hücre tipi ve değişik faktörler rol oynamaktadır; hem ekstrasellüler matriksin kendisi hem de aktive olmuş hücrelerin salgıladığı sitokinler aracılığı ile meydana gelen bir dizi olay ekstrasellüler matriks yapımında artış ve içeriğinde değişime yol açar. Hepatik stellat hücreler (HSC) ekstrasellüler matrix yapımından sorumlu ve fibrozis sürecinde rol oynayan esas hücrelerden biridir. HSC tarafından ekstrasellüler matriksin üretiminin artırılması neticesinde hepatik parankim hasarı, siroz ve portal hipertansiyon gelişimi görülür (Tucer 2008, Kitano ve Bloomston 2016).

Makrofajlar fibrojeniz sürecinde yer alan anahtar immün hücrelerdir ve kollajen üreten myofibroblastlarla yakın ilişki içindedirler. Toll like reseptörler ve T helper tip 1 (Th1) ile uyarılan makrofajlar (M1) ve Th2 sinyalleri ile alternatif yoldan uyarılan makrofajlar (M2) fibrozis sürecinde rol alırlar. IL-4 ve IL-13 gibi Th2 sitokinlerinin kronik ve otoimmün hastalıklarda farelerde fibrozis sürecinde önemli olduğu gösterilmiştir. IL-4 ve IL-13 ile indüklenen makrofajlar profibrojenik sitokinlerin salınımına neden olarak fibroblastları aktive ederler. Fare modellerinde makrofajlardan TGF β sekresyonunun engellenmesi ile karaciğer fibrozisinin inhibe edildiği gösterilmiştir. IL-4 ve IL-13 uyarımı ile akciğer makrofajlarından salınımı indüklenen Chemokine (C-C motif) ligand 18 (CCL18), idyopatik pulmoner fibrozis hastalarında fibroblastlardan kollajen üretimini uyarmaktadır (Su ve ark 2015).

Fibroziste iyileşme süreci, ekstrasellüler matriks (ESM) komponentlerinin yıkımı ve

yeniden yapılanması ile gerçekleşir. Karaciğer hasarına sebep olan etken ortadan kaldırılamaz ve inflamasyon süreci ilerlemeye devam ederse histopatolojik ve klinik tablo fibrozis ve sirozla sonuçlanır. Etiyoloji ne olursa olsun siroz gelişimi için gereken süre ortalama 10-20 yıldır. Etken ortadan kalktığında fibrozis süreci geri dönüşümlü olabilmektedir (Tucer 2008).

2.4.1 Karaciğer fibrozisinde histopatolojik inceleme

Karaciğer fibrozisinin tanı metodları arasında invaziv (karaciğer iğne biyopsisi) ve non-invaziv (biyokimyasal yöntemler, görüntüleme yöntemleri) yöntemler yer almaktadır. Karaciğer biyopsisi kronik hepatitli olgularda karaciğer fibrozis derecesini belirlemede günümüzde altın standart yöntemdir. Belirli zaman aralıkları ile biyopsiler alınarak hastada fibrozis derecesi takip edilir ve bu şekilde başta tedaviye yanıt olmak üzere hastanın progresyonu açısından değerlendirilme yapılabilir. Histopatolojik evrelemede fibrozisin yeri ve yaygınlığı ile septa ve nodül oluşumu değerlendirilir (Goodman 2007, Soyuer 2009).

Fibrozis kronik hepatitlerde, genellikle portal alanda başlar bu nedenle portal alana sınırlı fibrozis evre 1, periportal alana ulaşmış fibrozis evre 2 şeklinde değerlendirilmektedir. Oluşan fibrozis karaciğer parankim çatısını kısmen bozuyor, portal alanları birbirine veya santral venleri portal alanlara veya santral venleri birbirlerine bağlar tarzda köprüler oluşturuyor ise evre 3, siroz oluşmuş ise evre 4 olarak değerlendirilmektedir. Fibrozis evrelemesinde Knodell, Metavir, Ishak gibi farklı sınıflandırma çeşitleri mevcut olup bunlar arasında Ishak sınıflaması en hassas olan sınıflandırma yöntemi olarak kabul edilmektedir. Ishak sınıflamasında evreleme maksimum 6 üzerinden yapılmaktadır. Buna göre siroz 6, presirotik karaciğer 5, yaygın köprüleşme 4, seyrek köprüleşme 3, fibröz portal genişleme±kısa septum (yaygın) 2 ve fibröz portal genişleme±kısa septum (fokal) 1 numara ile değerlendirilmektedir (Goodman 2007, Soyuer 2009).

Tablo 2.1. Histolojik aktivite indeksi evrelendirmesi

Fibrozis	Skor
Fibröz portal genişleme±kısa septum (fokal)	1
Fibröz portal genişleme±kısa septum (yaygın)	2
Nadir portal-portal köprüleşme	3
Sık portal-portal köprüleşme	4
Sık köprüleşme fibrozisi ve nadir nodül oluşumu	5
Siroz	6

2.5 MikroRNA (miRNA)

MikroRNA (miRNA) bitkiler, hayvanlar ve bazı virüslerde bulunan yaklaşık 22 nükleotidden oluşan küçük protein kodlamayan (non-coding) RNA molekülüdür; RNA susturma ve genden protein sentezinin post transkripsiyonel düzenlenmesinde işlev görür.

İlk mikroRNA, 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans*'ın genlerinin taranması sonucunda, kısa protein kodlamayan ancak canlılığın gelişim zamanlamasını düzenleyen mikroRNA'nın keşfi ile ortaya konmuş, bu terim 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. miRNA araştırmaları; miRNA'ların farklı hücre tiplerinde ve dokularda farklı setler halinde bulunduğunu göstermiştir. Bitki ve hayvan hücrelerinde miRNA'ların birden fazla rolü olduğu ve birçok biyolojik süreçte etkin olduğu ortaya konmuştur. MiRNA'lar ökaryotik hücrelerin normal işleyişinde yer alırlar, bu nedenle miRNA'ların disregülasyonu hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (Lee ve ark 1993, Reinhart 2000, Ruvkun 2001, Lagos-Quintana 2001, Saydam ve ark 2011).

Kanser ve mikroRNA arasındaki ilişki üzerine yapılan araştırmalarda mikroRNA'ların tümör gelişiminde onkogen veya tümör süpresör olarak görev aldığı, hücrede miRNA seviyelerinin normal koşulların dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle mikroRNA seviyelerinin belirlenmesinin kanserin erken teşhisi ve tedavisi için önemli olabileceği tartışma konusu olmuştur (Saydam ve ark 2011).

2.5.1 MikroRNA biyosentezi

Tam uzunluktaki miRNA (pri-miRNA) RNA polimeraz II tarafından genomik DNA'dan transkripte edilir. Nükleer kompartmanda Drosha tarafından işlenir ve 65 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'lar üretilir. Pre-miRNA çekirdekten stoplazmaya taşınır ve RNAase III benzeri endonükleaz Dicer tarafından kesilir ve olgun form çift zincirli

miRNA'lar üretilir. Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. Çift zincir RNA bağlayan bir protein (Argonaute) içeren ve RNA induced silencing kompleks (RISC) olarak adlandırılan yapıya yüklenen miRNA burada komplementer hedef bölgeleri ile (çoğunlukla 3' UTR de) tam bir eşleşme olmadan birleşir ve hedef mRNA'yı parçalamadan ribozom ile birleşmesini önleyerek translasyonu engeller. miRNA'lar hedef gen ekspresyonunu, deadenilasyon ve degradasyonu indükleyerek veya translasyonel inhibisyon yaparak düzenler. Günümüze kadar >2500 insan miRNA'sı (hsa-mir) tanımlanmıştır ve mirbase.org, mirdb.org, targetscan.org gibi birçok database'den ulaşım mümkündür.

Viral miRNA'lar virüs lehine çalışarak viral ve/veya ev sahibi genin gen ekspresyonunun düzenlerler. Bu nedenle, miRNA'lar, konak-virüs etkileşimleri ve viral hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (Bernstein ve ark 2001, Li ve ark 2014, Yula ve Kaya 2015).

2.6 HBV miRNA ilişkisi

HBV ile miRNA arasındaki ilişkilerin aydınlatılması enfeksiyonun moleküler düzeyde patogeneğinin anlaşılması ile ve aşamalarının ortaya konması ile ivme kazanmıştır. Birçok miRNA'nın HBV üzerinde inhibe edici ve/veya HBV replikasyonunu artırıcı etkisi gösterilmiştir. HBV enfeksiyonu ve miRNA ilişkisine dair en çok çalışma miR122 üzerinde yapılmıştır. miR122 karaciğere özgü hepatositlerde en yüksek düzeyde tespit edilen miRNA çeşidi olup erişkin karaciğeriindeki miRNA popülasyonunun %70'ini oluşturur. Karaciğer hücresinin birçok basamaktaki fonksiyonunun düzenlenmesinden sorumlu olan miR122'nin HBV sekanslarına doğrudan bağlanma yolu ile viral gen ekspresyonu ve replikasyonunu negatif yönde etkileyebildiği gösterilmiştir.

miR-122'nin hepatoselüler karsinom, kronik hepatit veya ilaç, alkol ya da viral nedenli karaciğer hasarında serumda yükseldiği gösterilmiş, hepatoselüler kanserde miR-122'nin yeni bir kanser tanı, tedavi ve prognoz markerı olabileceği düşünülmüştür (Zhang ve ark 2010, Xu ve ark 2011, Zhou ve ark 2011, Onan 2012).

HBV enfeksiyonunda regülasyonu bozuk olan miRNA'lar tanımlanmıştır. Konak immün sistemini modüle eden miRNA'lardan miR-146a ve miR-155'de artış, miR-548'de azalma görülmüştür. HBV kopyalarını hedef alan miRNA'lardan miR-17-92, miR-125a-5p, miR-199a-3p, miR-210'da artış; miR-15a, miR-122, miR-205'de azalma; HBV enfeksiyonunun düzenleyicilerini hedef alan miRNA'lardan miR-22, miR-155, miR-372,

miR-501'de artış; miR-1, miR-29c, miR-122, miR-152'de azalma izlenmiştir (Yula ve Kaya 2015).

Karaciğer hasarının sebebine yönelik spesifik düzeyde miRNA araştırmalarının karaciğer hastalıklarının tanısında biyomarker olarak kullanılabileceği düşünölmüş, Li ve arkadaşları karaciğer hasarı sebebini %96,9'un üzerinde hassasiyet ve özgülükle gösterebilecek kanda miRNA karaciğer paneli oluşturmuşlardır (Li ve ark 2010).

Yapılan çalışmalar sonucu miRNA ve virüs etkileşimleri ortaya kondukça miRNA'ların tedavi için gelecekte kullanılabilirliği sorgulanmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda miRNA-122'nin HCV genomuna bağlandığı ve replikasyonunu kolaylaştırdığı, bu miRNA'yı hedef alan bir antiviralin kronik HCV tedavisinde kullanılabileceği düşünölmüştür. Ancak bu miRNA'nın down regulasyonu ile HCC riskinde artış izlenmesi nedeniyle HCV tedavisinde kullanıma uygunluk için optimal seviyenin belirlenmesi ve bu konuda yeni araştırmalar yapılması gerektiği ortaya konmuştur (Israelow ve ark 2014, Bandiera ve ark 2015).

2.7 Fibrozis miRNA ilişkisi

HBV ilişkili fibrozis ve sirozda miRNA'nın rolünü açıklamak ve bu fazda ekspresyon profillerini incelemek için birçok araştırma yapılmakta ve farklı miRNA'ların etkileri ortaya konmaya çalışılmaktadır. Kronik HBV'de rol alan ve düzeyinde artış görölen miRNA'lardan bazılarına örnek olarak miR-146a, miR-155, miR-181a, miR-145-5p, miR-146b-5p, miR-148a, miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-455, miR-1, miR-21 ve miR-125; azalanlara örnek olarak Let-7 ailesi ve miR-548 verilebilir. HBV ile ilişkili sirozda miR-33a ve miR-615-3p artışı; miR-19b, miR-29, miR-150 ve miR-194 azalışı izlenir (Kitab ve ark 2015).

Guo ve ark. hepatik satellit hücre aktivasyonu sırasında eksprese edilen miRNA'lar ve bunlar tarafından düzenlenen farklı sinyal yollarını tanımlamıştır (Guo ve ark 2009).

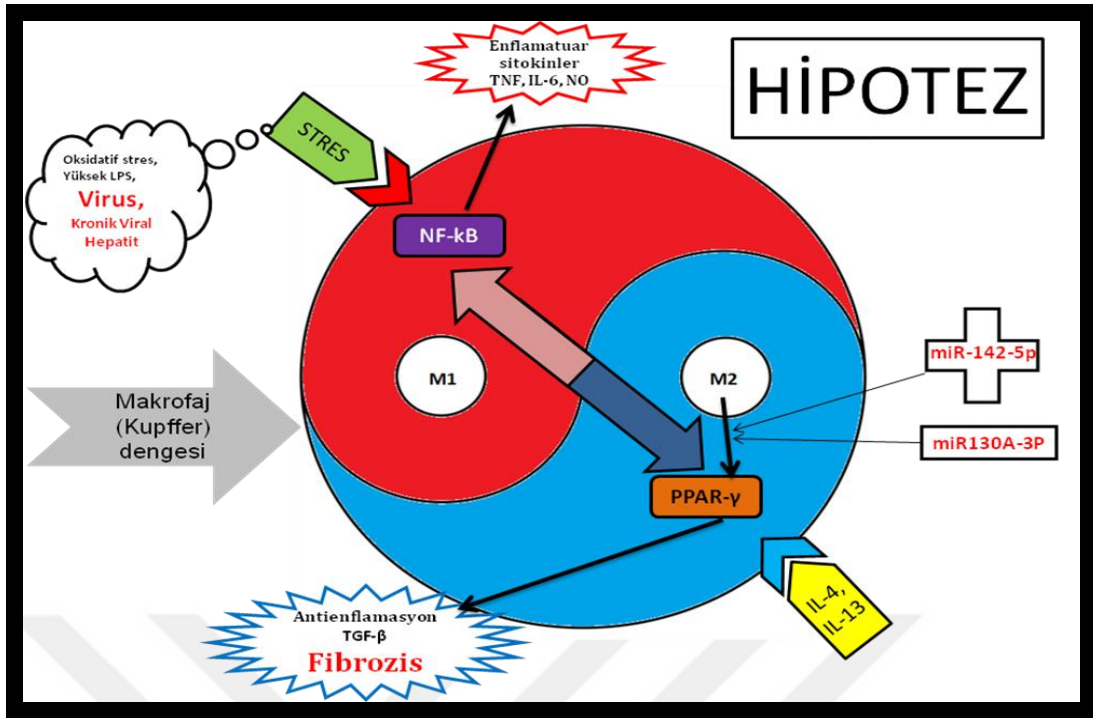
Kronik hepatit etyolojileri farklı da olsa hepatik hasarı takiben artan transforming growth factor- β (TGF β)'nin hepatik stellat hücreler (HSC) aracılı fibrojenizde en potent uyarı sağlayan sitokin olduğu bildirilmiştir. TGF β fibrozisi indüklemeye birçok yol kullanır. Bunlar; HSC'nin direk aktivasyonu ile ekstraselöler matriks sentezini (ESM) uyararak, metalloproteaz doku inhibitörlerini uyararak ESM yıkımını inhibe etmek, kendi geni üzerindeki Activator protein 1 (AP-1) bölgesi aracılığı ile kendi sentezini arttırmaktır (Brenner 2009).

Lakner ve ark.'nın yaptığı çalışmada miR-19b'nin TGF β aracılığı ile HSC aracılı

fibrojenesi inhibe ettiği gösterilmiştir (Lakner ve ark 2012). Venugopal ve ark. karaciğer fibrozisinin miR-150 ve miR-194 düzeyine azalmaya neden olduğunu, miRNA'ların fazla ekspresyonlarının HSC aktivasyonunu baskıladığını göstermişlerdir. Bu miRNA'lar karaciğer rejenerasyonunun erken evresinde gelişen feed back mekanizması ile down regule olurlar (Venugopal ve ark 2010). Roderburg ve ark., yaptıkları çalışmada miR-29b'nin HSC aktivasyonu sırasında down regule olduğunu; miR-29b'nin murinlerde fazla ekspresyonunun ise kollagen ekspresyonunu engellediğini göstermişlerdir (Roderburg ve ark 2011). Bir diğer çalışmada karaciğer fibrozisi ilerledikçe miR-199 ve miR-200'n üretiminin arttığı gösterilmiştir (Murakami ve ark 2011). Huang ve ark.'nin yaptığı çalışmada kronik hepatit B'li hastalarda HSC'nin TGF-β1 ile uyarımının miR-33a ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Huang CF ve ark 2015).

IL-4 / IL-13 tarafından yukarı regüle edilen ve STAT6 hedef gen promoterleri ile sinerjik etkileşim gösteren peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör γ (PPARγ), M2 aktivasyonu için gereklidir. Artmış miR-142-5p ve azalmış miR-130a-3p'nin, IL-4/IL-13 hedefi SOCS1 ve PPARγ'nin uyarılmasıyla kronik enflamasyonda makrofajların profibrogenesisini düzenlediği kültüre edilmiş makrofajlar ve farelerde yapılan çalışmalar ile rapor edilmiştir (şekil 2.2) (Su ve ark 2015).

miRNA'ların etkili olduğu çok sayıda yolağın tanımlanması, fibrozis patogenezinde miRNA'ların rollerine dair bilgilerimizin ilerlemesini sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda terapötik müdahale için yeni hedefler sağlayabilecektir. Çalışmamızda, kronik hepatit B hastalarının serum örneklerinde miR-142-5p ve miR-130a-3p düzeylerinin belirlenmesinin viral hepatite bağlı fibroziste tanı belirteci ve tedavi hedefi olarak kullanıma uygunluğunu araştırmayı amaçladık.



Şekil 2.2 Hipotez

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Hasta seçimi

1 Ocak 2015-1 Aralık- 2016 yılları arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalında kronik hepatit B tanısı alarak histopatolojik tanı için perkutan karaciğer biyopsisi endikasyonu konan toplam 92 hasta çalışmaya alındı.

3.2 Serum örnekleri

Hastaların periferik kan örnekleri klasik sarı kapaklı tüpe alınarak 3700 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen serum mikrotüplere aktarıldı ve çalışılmak üzere - 20 °C'de saklandı.

3.3 Fibrozis evrelemesi

Olguların karaciğer biyopsileri modifiye İshak skoruna göre değerlendirilerek evre 1-6 olmak üzere fibrozis dereceleri belirlendi. miRNA düzey farklılıklarının karşılaştırılması amacıyla fibrozis evre 1 grubundaki hastalar kontrol grubu olarak seçildi. Fibrozis evresine göre hastalar 1-6 arasında gruplara ayrıldı.

3.4 miRNA izolasyonu

miRNA izolasyonu Applied Biosystems StepOnePlus cihazı ile GeneAll, Hybrid-R miRNA (Cat no:325-150, Lot no: 32515L09024) kiti kullanılarak yapıldı. İzolasyon uygulaması üretici firma önerilerine göre gerçekleştirildi:

1. İzolasyona başlanmadan önce serumlar oda sıcaklığına getirildi
2. 200µL serum+ 500µL RiboEx pipetaj yaparak eklendi (RiboEx içerdiği fenol ve guanidin tuzu ile hücreyi hızla parçalar ve nükleazları inaktive eder).
3. 5 dk oda ısısında inkübe edildi.
4. 1,5ml lik tüp üzerine 100µl kloroform eklendi. Kloroform RiboEx ve serum örneğine karışması için alt üst yapıldı ve 2 dk oda ısısında bekletildi.(Kloroform ile elde ettiğimiz lizat sulu ve organik faza kolayca ayrılır).
5. 12,000g de 4°C de santrifüj yapıldı ve sulu faz başka bir eppendorfa aktarıldı (DNA ve protein ara fazda ve organik fazda kalırken, total RNA sulu fazda bulunur).
6. Alınan sulu faz kadar üzerine %50 etanol eklendi, pipetaj yapıldı.

7. Elde edilen mix type B kolona aktarıldı (Burada büyük RNA membrana bağlanırken, küçük RNA'lar kolondan aşağı doğru iner).
8. 11,000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.
9. Altta kalan tüpün üzerine kalan sıvının hacmi kadar %100 etanol eklendi. Pipetaj yapıldı.
10. Bu karışım (yaklaşık 650µL) type W kolona aktarıldı (Bu kolon küçük RNA ların bağlanmasını sağlar).
11. 11,000rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.
12. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine 500µL RBW Buffer eklendi (Bu basamakta deterjan içeriğinde bulunan yıkama basamağı gerçekleştirilir. Böylece membrana bağlanmış olan küçük RNA dışındaki artıklar uzaklaştırılır).
13. 11,000rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.
14. Collection tüp yenisi ile değiştirdi ve üzerine 500µL RNW Buffer eklendi.
15. 11,000rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.
16. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine 500µL RNW Buffer eklendi.
17. 11,000rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.
18. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine hiçbirşey eklenmeden 11,000rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
19. Daha sonra membranın tam merkezine gelecek şekilde 50µL RNase-free su eklendi. 2 dk oda sıcaklığında bekletildi.
20. 11,000rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
21. Elde edilen örnek -20°C'ye aktarıldı.

3.4.1 Primerler

miR-142-5p ve miR-130a-3p saptanması amacıyla bu miRNA'ları amplifiye etmek için uygun primer dizileri dizayn edildi (Varkonyi-Gasic ve Hellens 2011). Kontrol olarak U6 gen bölgesine ait diziler kullanıldı.

Tablo 3.1. PCR için kullanılan primerler

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ	SKALA(nmol)
142-RT	5'CTTGCATAGTGCGCGTAATAATCCATAAAGT'3	100nmol
142-F	5'GGAATCCCTGTAGTGTTCCTACT'3	100nmol
142-R	5'CCTTGCATAGTGCGCGTAATAA'3	100nmol
130-RT	5'GAGGCGACTGCCTAAACTATGCCCTTT'3	100nmol
130-F	5'GCCAGCCAGTGCAATGTAAAA'3	100nmol
130-R	5'TACTGAGGCGACTGCCTAAACT'3	100nmol
U6-F	5'ATACGATACAAGGCTGTTAGAG'3	100nmol
U6-R	5'AAATATGGAACGCTTCACGA'3	100nmol

3.4.2 cDNA sentezi

Elde edilen miRNA'dan HyperScript First strand synthesis Kit, Cat no:601-005 kullanılarak complementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Her örneğin kendi stem-loop primeri ile cDNA sentezi yapıldı.

Tablo 3.2. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler

Bileşenler	
NF Water	8 µl
Stem-loop primer	1 µl
10mMdNTP	1 µl
miRNA	4 µl
TOTAL	14 µl

1. 65°C'de 5 dakika bekletildi ve primer denatürasyonu sağlandı.
2. Hemen buz üzerine alındı.

Bileşenler	
10X First S.Buffer	2 µl
0,1M DTT	2 µl
Enzim	1 µl

RNase İnhibitor(40U/ µl)	1 µl
--------------------------	------

3. Hazırlanan mix 6 µl olarak her bir örnek üzerine dağıtıldı ve PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. PCR reaksiyonu döngüsü

16°C	30dakika	60X
30°C	30 saniye	
42°C	30 saniye	
50°C	1 saniye	
85°C	5 dakika	

3.4.3 Real time PCR

Elde edilen cDNA'lardan SYBR Green temelli Real Time PCR kuruldu. PCR reaksiyonu Applied Biosystems StepOnePlus cihazı ile yapıldı.

Tablo 3.4. Real time PCR için reaksiyon miksi bileşenleri

PCR BİLEŞENLERİ	1X
2X SYBR GREEN MASTER MIX (Cat No:801-520, Lot no:QP116G25001)	10µL
F(10pm)	1µL
R(10pm)	1µL
ROX	1,5µL
cDNA	5µL
Su	1,5µL
TOPLAM	20µL

3.4.3.1 Amplifikasyon

Tüplerin üstü kapatılarak iQ5 Real Time PCR Detection System (BIO-RAD) cihazına yerleştirildi. 10 dk 95 °C'de bekletildikten sonra 15 sn 95°C'den ve 45 sn 55 °C'den oluşan siklustan 40 tekrar yapılacak şekilde programlandı ve amplifikasyon gerçekleştirildi.

3.5 Sonuç değerlendirme ve istatistiksel analiz

Fibrozis evresine göre 6 gruba ayrılan hastaların real time PCR sonucu elde edilen CT değerleri, Kantitatif PCR metodu veri analizi için Rao ve ark. tarafından önerilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak değerlendirildi;

$$\Delta CT = CT (\text{hedef örnek}) - Ct (\text{referans örnek})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{hedef örnek}) - \Delta Ct (\text{referans örnek})$$

Bu metod ile PCR sonucu farklı örneklerden elde edilen threshold cycles (CTs) değerleri kullanılarak örnekler arasındaki gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı (Rao ve ark 2013).

Kontrol grubu olarak seçilen grup 1'de yer alan örneklere ve U6 gen bölgesine yönelik uygulanan PCR sonucu elde edilen CT değerleri ile ΔCT hesaplandı ve sonraki $\Delta\Delta Ct$ hesaplaması için kontrol değerleri oluşturuldu (ΔCT kontrol).

Grup 2-5' de yer alan her bir hastaya ait örneklere ve U6 gen bölgesine yönelik uygulanan PCR sonucu elde edilen CT değerleri ile ΔCT hesaplandı sonraki $\Delta\Delta Ct$ hesaplaması için hedef değerleri oluşturuldu (ΔCT hasta).

Elde edilen ΔCT hasta ve ΔCT kontrol değerleri kullanılarak gruplara ait $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplandı. Sonrasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü uygulanarak sonuçlar elde edildi ve ortalama hesaplanarak gruba ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri saptandı.

Gruplar arası $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri farkları ANOVA yöntemi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6 Etik Kurul Onayı

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, İlaç ve Tıbbi Cihaz dışı Araştırmalar Etik Kurulundan 27.05.2016 tarihinde 2016/578 karar sayısı ile etik kurul onayı alınmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 92 hastanın fibrozis evrelemesi yapıldı ve 18 hasta fibrozis evre 1, 28 hasta fibozis evre 2, 18 hasta fibozis evre 3, 10 hasta fibozis evre 4, 2 hasta fibozis evre 5 ve 16 hasta fibozis evre 6 olarak tespit edildi; bu hastalar evre numaralandırmalarına uyumlu şekilde grup1-6 içerisinde sınıflandırıldı.

miR-130a-3p için grup 2,3,4,5 ve 6' da yer alan örneklerin ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri sırasıyla 2.87, 2.69, 1.34, 1.11 ve 1.01 olarak tespit edildi. miR-142-5p için grup 2,3,4,5 ve 6'da yer alan örneklerin ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri sırasıyla 1.17, 0.65, 0.09, 0.06 ve 0.22 olarak tespit edildi. Hastalara ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri ve grupların ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri tablo ve grafiklerde gösterilmiştir.

Kontrol grubu olan grup 1 ile kıyaslandığında tüm gruplarda miR-130a-3p ekspresyon miktarında artış izlendi. Grup 2-6 kendi aralarında kıyaslandığında grup düzeyi arttıkça miR-130a-3p ekspresyon miktarında lineer azalma izlendi ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.0001$). Gruplar arasındaki istatistiksel analiz incelendiğinde grup 2 ve 6, grup 3 ve 6, grup 2 ve 4 arasındaki ekspresyon farkları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Grup 2'de kontrol grubuna göre miR-142-5p ekspresyon miktarında artış; grup 3,4,5 ve 6'da ise azalma izlendi. Gruplar arasındaki ekspresyon farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.1. Grup 2 için miR-130a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Hasta No	miR-130a CT	U6 CT	KONTROL No	miR-130a CT	U6 CT	ΔCt (hasta)	ΔCt (kontrol)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
22	28,70	30,40	7	29,10	30,59	-1,70	-1,49	-0,21	1,15668818
23	31,42	29,92	8	32,46	29,93	1,50	2,53	-1,03	2,04202425
24	29,14	29,44	9	31,71	30,07	-0,30	1,64	-1,94	3,83705648
25	28,34	29,87	10	29,19	29,29	-1,53	-0,10	-1,43	2,69446715
26	30,60	29,22	11	32,44	29,31	1,38	3,13	-1,75	3,36358566
27	30,13	28,81	12	32,54	29,51	1,32	3,03	-1,71	3,27160823
28	29,98	30,00	13	28,89	29,49	-0,02	-0,60	0,58	0,66896378
29	29,82	29,56	14	32,33	29,72	0,26	2,61	-2,35	5,09824251
30	30,95	30,19	15	32,46	29,47	0,76	2,99	-2,23	4,69133980
38	30,87	28,95	16	33,01	29,79	1,92	3,22	-1,30	2,46228883
40	27,40	29,73	17	29,07	29,15	-2,33	-0,08	-2,25	4,75682846
45	30,25	29,77	18	31,80	29,49	0,48	2,31	-1,83	3,55537073
47	29,89	28,42	19	32,80	29,98	1,47	2,82	-1,35	2,54912126
49	27,05	27,62	20	29,92	29,15	-0,57	0,77	-1,34	2,53151319
50	28,45	29,47	21	29,65	30,81	-1,02	-1,16	0,14	0,90751916
51	23,60	29,64	106	24,44	28,42	-6,04	-3,98	-2,06	4,16986304
52	27,70	29,75	110	28,30	29,26	-2,05	-0,96	-1,09	2,12874036
53	24,13	30,06	113	25,37	28,60	-5,93	-3,23	-2,70	6,49801917
54	27,77	30,21	7	29,10	30,59	-2,44	-1,49	-0,95	1,93187266
55	29,82	28,96	8	32,46	29,93	0,86	2,53	-1,67	3,18214594
56	29,36	29,97	9	31,71	30,98	-0,61	0,73	-1,34	2,53151319
105	25,36	28,42	10	29,19	30,29	-3,06	-1,10	-1,96	3,89061979
107	28,36	27,88	11	32,44	30,83	0,48	1,61	-1,13	2,18858740
108	28,13	28,30	12	32,54	31,21	-0,17	1,33	-1,50	2,82842712
109	28,95	28,77	13	28,89	29,49	0,18	-0,60	0,78	0,58236679
111	29,62	29,71	14	32,33	31,12	-0,09	1,21	-1,30	2,46228883
112	29,96	29,32	15	32,46	31,21	0,64	1,25	-0,61	1,52625921
									2,87064152

Tablo 4.2. Grup 3 için miR-130a-2^{-ΔΔCT} sonucu

Hasta No	miR-130a CT	U6 CT	KONTROL No	miR-130a CT	U6 CT	ΔCt (hasta)	ΔCt (kontrol)	ΔΔCt	2-ΔΔCt
57	27,54	29,23	7	29,1	30,59	-1,69	-1,49	-0,20	1,148698355
59	27,07	29,38	8	29,6	30,92	-2,31	-1,32	-0,99	1,986184991
60	29,19	30,31	9	30,86	30,3	-1,12	0,56	-1,68	3,20427951
61	29,33	29,43	10	31,86	30,29	-0,10	1,57	-1,67	3,182145935
62	29,02	29,89	11	30,85	29,69	-0,87	1,16	-2,03	4,084048503
63	29,96	29,76	12	31,89	30,01	0,20	1,88	-1,68	3,20427951
64	30,01	29,86	13	30,25	29,49	0,15	0,76	-0,61	1,526259209
65	29,07	29,54	14	32,33	29,72	-0,47	2,61	-3,08	8,456144324
66	27,07	29,67	15	29,3	30,25	-2,60	-0,95	-1,65	3,138336392
67	29,6	29,8	16	31,02	29,79	-0,20	1,23	-1,43	2,694467154
68	29,17	29,42	17	29,07	29,15	-0,25	-0,08	-0,17	1,125058485
69	29,91	29,3	18	31	29,49	0,61	1,51	-0,90	1,866065983
70	26,12	24,93	19	32,8	29,98	1,19	2,82	-1,63	3,095129987
71	26,7	29,17	20	28,6	30,2	-2,47	-1,60	-0,87	1,8276629
72	29,6	28,73	21	32,58	30,81	0,87	1,77	-0,90	1,866065983
73	29,9	29,11	106	30,2	29,6	0,79	0,60	0,19	0,876605721
74	28,08	30,3	110	29,36	30,2	-2,22	-0,84	-1,38	2,602683711
									2,699065686

Tablo 4.3. Grup 4 için miR-130a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Hasta No:	miR-130a CT	U6 CT	KONTROL No:	miR-130a CT	U6 CT	ΔCt (hasta)	ΔCt (kontrol)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
75	28,52	26,16	7	29,1	27,3	2,36	1,8	0,56	0,678302164
76	28,74	26,09	8	32,46	29,93	2,65	2,53	0,12	0,920187651
77	30,04	28,44	9	31,71	30,07	1,6	1,64	-0,04	1,028113827
78	28,6	26,65	10	29,19	27	1,95	2,19	-0,24	1,180992661
79	28,59	26,6	11	32,44	29,9	1,99	2,54	-0,55	1,464085696
80	26,71	24,06	12	32,54	29,51	2,65	3,03	-0,38	1,301341855
81	25,98	27,33	13	28,89	29,49	-1,35	-0,6	-0,75	1,681792831
82	28,65	28,95	14	31	30	-0,3	1	-1,3	2,462288827
83	28,27	26	15	32,46	29,47	2,27	2,99	-0,72	1,647182035
85	30,04	27	16	33,01	29,79	3,04	3,22	-0,18	1,132883885
									1,349717413

Tablo 4.4. Grup 5 için miR-130a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Hasta No:	miR-130a CT	U6 CT	KONTROL No:	miR-130a CT	U6 CT	ΔCt (hasta)	ΔCt (kontrol)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
87	29,68	29,2	7	29,1	28,6	0,48	0,5	-0,02	1,01395948
88	28,63	28,59	8	30,25	29,93	0,04	0,32	-0,28	1,214194884
									1,114077182

Tablo 4.5. Grup 6 için miR-130a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Hasta No:	miR-130a CT	U6 CT	KONTROL No:	miR-130a CT	U6 CT	ΔCt (hasta)	ΔCt (kontrol)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
84	28,52	28,72	7	29,10	30,59	-0,2	-1,49	1,29	0,40895103
86	27,33	28,33	8	29,82	30,01	-1	-0,19	-0,81	1,75321144
89	28,14	28,12	9	30,01	30,07	0,02	-0,06	0,08	0,94605765
90	26,32	26,51	10	29,19	30,29	-0,19	-1,10	0,91	0,53218509
91	26,62	28,61	11	27,62	29,63	-1,99	-2,01	0,02	0,98623270
92	27,4	27,26	12	29,36	29,51	0,14	-0,15	0,29	0,81790206
93	26,57	27,33	13	28,89	29,49	-0,76	-0,60	-0,16	1,11728714
94	27,63	28,9	14	29,36	29,72	-1,27	-0,36	-0,91	1,87904550
95	28,41	28,56	15	28,46	29,47	-0,15	-1,01	0,86	0,55095256
96	28,71	28,67	16	29,03	29,79	0,04	-0,76	0,80	0,57434918
97	29,87	28,85	17	29,07	29,15	1,02	-0,08	1,10	0,46651650
98	28,91	28,01	18	31,00	29,49	0,9	1,51	-0,61	1,52625921
99	29,17	28,43	19	30,80	29,98	0,74	0,82	-0,08	1,05701804
100	25,36	26,1	20	28,97	29,35	-0,74	-0,38	-0,36	1,28342590
101	28,24	27,1	21	32,58	30,81	1,14	1,77	-0,63	1,54756499
104	28,94	28,81	106	28,63	28,82	0,13	-0,19	0,32	0,80106988
									1,01550180

Tablo 4.6. Grup 2 için miR-142-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Hasta No:	miR-142-5p CT	U6 CT	KONTROL No:	miR-142-5p CT	U6 CT	ΔCt (hasta)	ΔCt (kontrol)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
22	34,14	30,40	7	33,18	30,59	3,74	2,59	1,15	0,45062523
23	35,85	29,92	8	33,13	29,93	5,93	3,20	2,73	0,15072598
24	33,20	29,44	9	32,72	30,07	3,76	2,65	1,11	0,46329403
25	34,34	29,87	10	32,96	30,29	4,47	2,67	1,80	0,28717459
26	31,78	29,22	11	32,58	26,86	2,56	5,72	-3,16	8,93829710
27	34,55	28,81	12	33,44	29,51	5,74	3,93	1,81	0,28519093
28	34,09	30,00	13	33,43	29,49	4,09	3,94	0,15	0,90125046
29	34,47	29,56	14	33,79	29,72	4,91	4,07	0,84	0,55864357
30	33,54	30,19	15	33,76	29,47	3,35	4,29	-0,94	1,91852824
38	33,82	27,01	16	33,22	29,79	6,81	3,43	3,38	0,09605470
40	33,96	29,73	17	33,25	29,15	4,23	4,10	0,13	0,91383145
45	33,45	29,77	18	33,72	29,49	3,68	4,23	-0,55	1,46408570
47	32,92	29,87	19	33,69	29,98	3,05	3,71	-0,66	1,58008262
49	33,34	29,83	20	33,87	29,63	3,51	4,24	-0,73	1,65863909
50	33,72	29,47	21	32,90	30,81	4,25	2,09	2,16	0,22375627
51	34,53	29,64	106	35,83	28,42	4,89	7,41	-2,52	5,73582099
52	33,10	29,75	110	33,45	29,26	3,35	4,19	-0,84	1,79005014
53	33,71	30,06	113	33,82	28,60	3,65	5,22	-1,57	2,96904714
54	34,44	30,21	7	33,18	30,59	4,23	2,59	1,64	0,32085647
55	35,97	28,96	8	33,13	29,93	7,01	3,20	3,81	0,07129773
56	35,36	29,97	9	32,72	30,07	5,39	2,65	2,74	0,14968484
105	34,71	28,42	10	32,96	30,29	6,29	2,67	3,62	0,08133387
107	35,82	27,88	11	32,58	26,86	7,94	5,72	2,22	0,21464136
108	35,44	28,30	12	33,44	29,51	7,14	3,93	3,21	0,10806715
109	35,06	28,77	13	33,43	29,49	6,29	3,94	2,35	0,19614602
111	37,14	29,71	14	33,79	29,72	7,43	4,07	3,36	0,09739557
112	36,43	26,66	15	33,76	29,47	9,77	4,29	5,48	0,02240555
									1,17210840

Tablo 4.7. Grup 3 için miR-142-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Hasta No:	miR-142-5p CT	U6 CT	KONTROL No:	miR-142-5p CT	U6 CT	ΔCt (hasta)	ΔCt (kontrol)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
57	34,00	29,23	7	33,18	30,59	4,77	2,59	2,18	0,22067575
59	33,85	29,38	8	33,13	29,93	4,47	3,20	1,27	0,41465977
60	34,34	30,31	9	32,72	30,07	4,03	2,65	1,38	0,38421880
61	33,43	27,06	10	32,96	30,29	6,37	2,67	3,70	0,07694653
62	35,13	30,56	11	32,58	26,86	4,57	5,72	-1,15	2,21913894
63	33,67	29,76	12	33,44	29,51	3,91	3,93	-0,02	1,01395948
64	36,22	29,86	13	33,43	29,49	6,36	3,94	2,42	0,18685616
65	35,46	29,54	14	33,79	29,72	5,92	4,07	1,85	0,27739237
66	33,46	29,67	15	33,76	29,47	3,79	4,29	-0,50	1,41421356
67	34,43	29,80	16	33,22	29,79	4,63	3,43	1,20	0,43527528
68	35,33	29,42	17	33,25	29,15	5,91	4,10	1,81	0,28519093
69	34,73	29,30	18	33,72	29,49	5,43	4,23	1,20	0,43527528
70	36,15	24,93	19	33,69	29,98	11,22	3,71	7,51	0,00548611
71	34,74	29,17	20	33,87	29,36	5,57	4,51	1,06	0,47963206
72	35,66	28,73	21	32,90	30,81	6,93	2,09	4,84	0,03491522
73	35,53	29,11	106	35,83	28,42	6,42	7,41	-0,99	1,98618499
74	35,21	27,90	110	36,87	29,26	7,31	7,61	-0,30	1,23114441
									0,65300974

Tablo 4.8. Grup 4 için miR-142-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

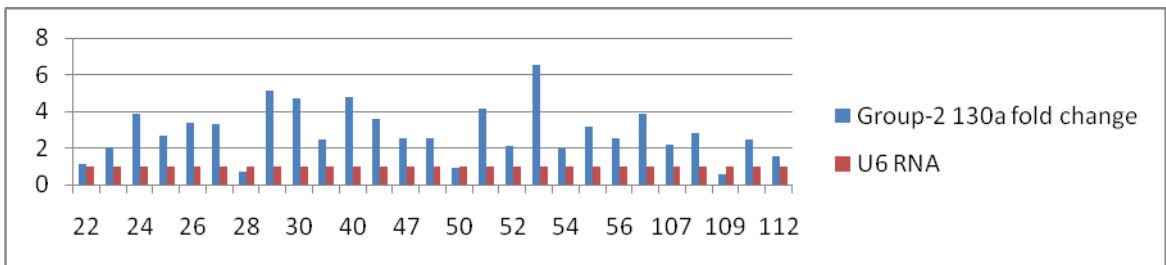
Hasta No:	miR-142-5p CT	U6 CT	KONTROL No:	miR-142-5p CT	U6 CT	ΔCt (hasta)	ΔCt (kontrol)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
75	35,80	22,16	7	33,18	30,59	13,64	2,59	11,05	0,00047165
76	35,31	26,09	8	33,13	29,93	9,22	3,20	6,02	0,01540989
77	35,53	28,44	9	32,72	30,07	7,09	2,65	4,44	0,04607091
78	35,23	26,65	10	32,96	30,29	8,58	2,67	5,91	0,01663078
79	35,42	28,83	11	32,58	26,86	6,59	5,72	0,87	0,54714685
80	35,21	24,06	12	33,44	29,51	11,15	3,93	7,22	0,00670754
81	35,15	27,33	13	33,43	29,49	7,82	3,94	3,88	0,06792093
82	36,00	28,95	14	33,79	29,72	7,05	4,07	2,98	0,12674493
83	35,04	27,22	15	33,76	29,47	7,82	4,29	3,53	0,08656934
85	36,25	21,90	16	33,22	29,79	14,35	3,43	10,92	0,00051612
									0,09141890

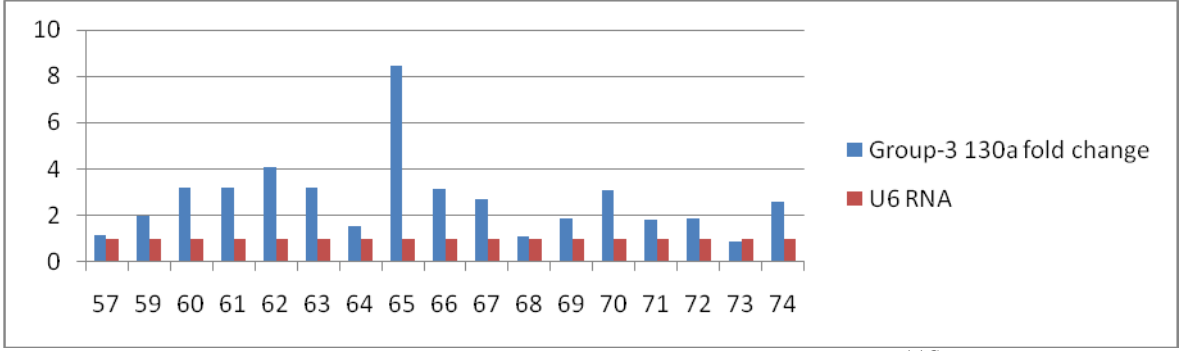
Tablo 4.9. Grup 5 için miR-142-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Hasta No:	miR-142-5p CT	U6 CT	KONTROL No:	miR-142-5p CT	U6 CT	ΔCt (hasta)	ΔCt (kontrol)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
87	36,02	27,39	7	33,18	30,59	8,63	2,59	6,04	0,01519773
88	34,91	28,59	8	33,13	29,93	6,32	3,20	3,12	0,11502346
									0,06511059

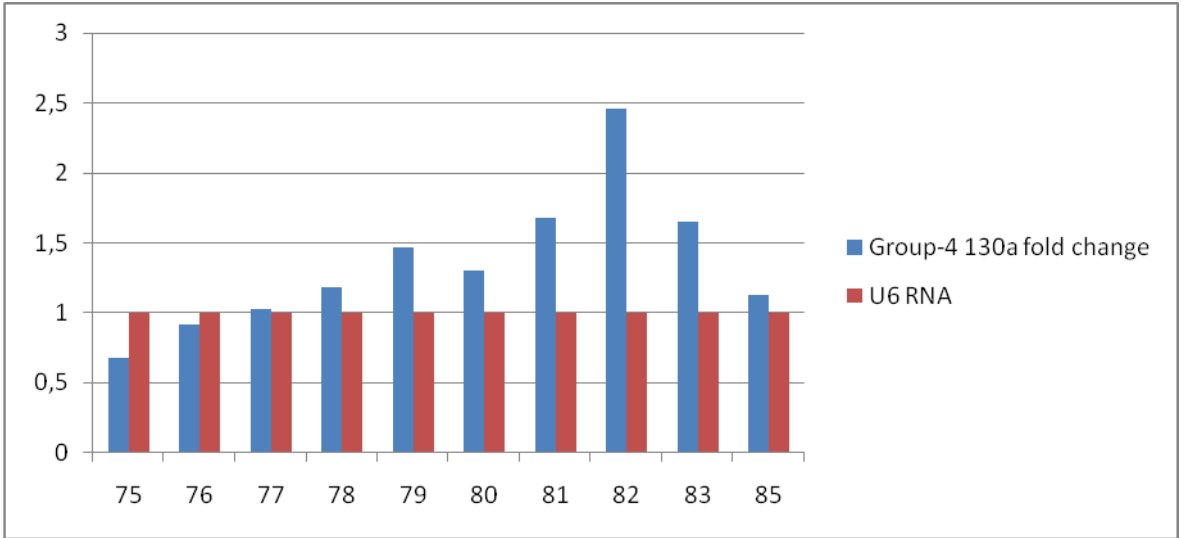
Tablo 4.10. Grup 6 için miR-142-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonucu

Hasta No:	miR-142-5p CT	U6 CT	KONTROL No:	miR-142-5p CT	U6 CT	ΔCt (hasta)	ΔCt (kontrol)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
84	35,87	25,73	7	33,18	30,59	10,14	2,59	7,55	0,00533609
86	35,85	28,33	8	33,13	29,93	7,52	3,20	4,32	0,05006687
89	36,07	27,36	9	32,72	30,07	8,71	2,65	6,06	0,01498850
90	35,34	28,51	10	32,96	30,29	6,83	2,67	4,16	0,05593907
91	35,26	28,61	11	32,58	26,86	6,65	5,72	0,93	0,52485834
92	35,19	27,26	12	33,44	29,51	7,93	3,93	4,00	0,06250000
93	36,19	27,33	13	33,43	29,49	8,86	3,94	4,92	0,03303181
94	35,27	28,90	14	33,79	29,72	6,37	4,07	2,30	0,20306310
95	35,40	28,56	15	33,76	29,47	6,84	4,29	2,55	0,17075503
96	34,20	28,67	16	33,22	29,79	5,53	3,43	2,10	0,23325825
97	35,48	28,85	17	33,25	29,15	6,63	4,10	2,53	0,17313868
98	34,72	29,01	18	33,72	29,49	5,71	4,23	1,48	0,35848881
99	35,18	28,43	19	33,69	29,98	6,75	3,71	3,04	0,12158187
100	35,69	26,10	20	33,87	25,90	9,59	8,97	0,62	0,65067093
101	35,09	27,10	21	32,90	30,81	7,99	2,09	5,90	0,01674646
104	35,68	28,81	106	35,13	28,90	6,87	6,23	0,64	0,64171295
									0,22072004

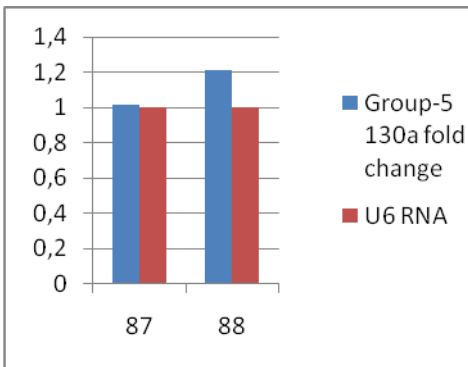
**Şekil 4.1** 2.grup örneklerinin miR-130a-3p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)



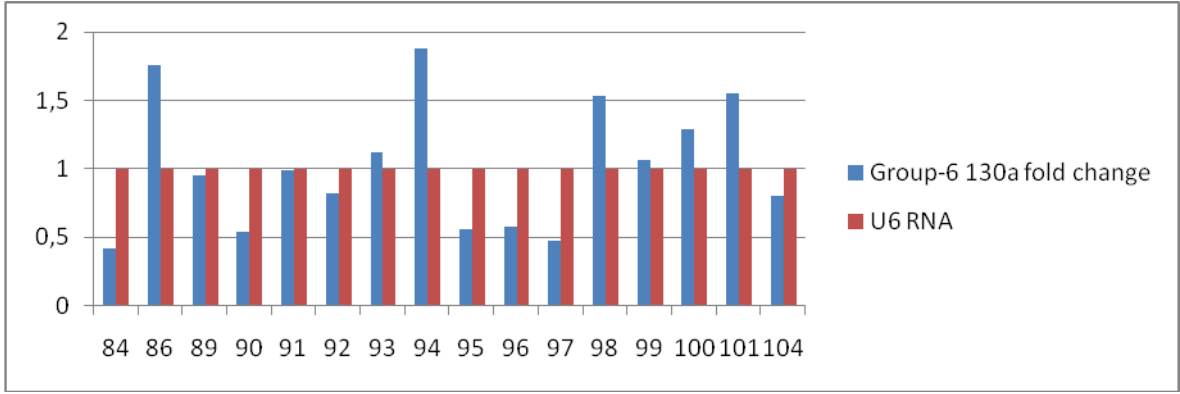
Şekil 4.2 3.grup örneklerinin miR-130a-3p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)



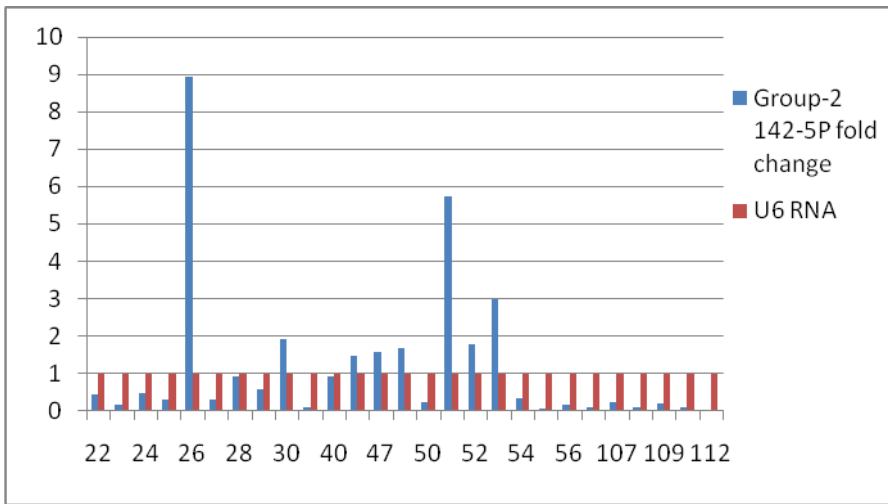
Şekil 4.3 4.grup örneklerinin miR-130a-3p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)



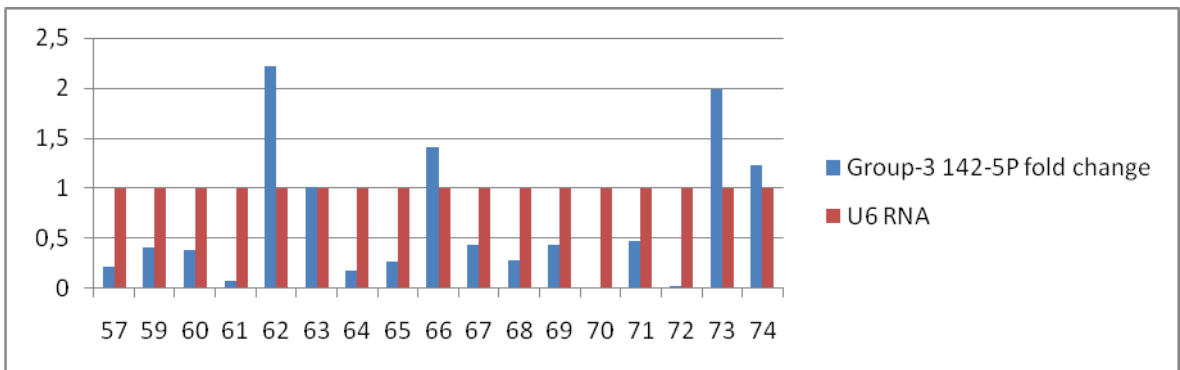
Şekil 4.4 5.grup örneklerinin miR-130a-3p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)



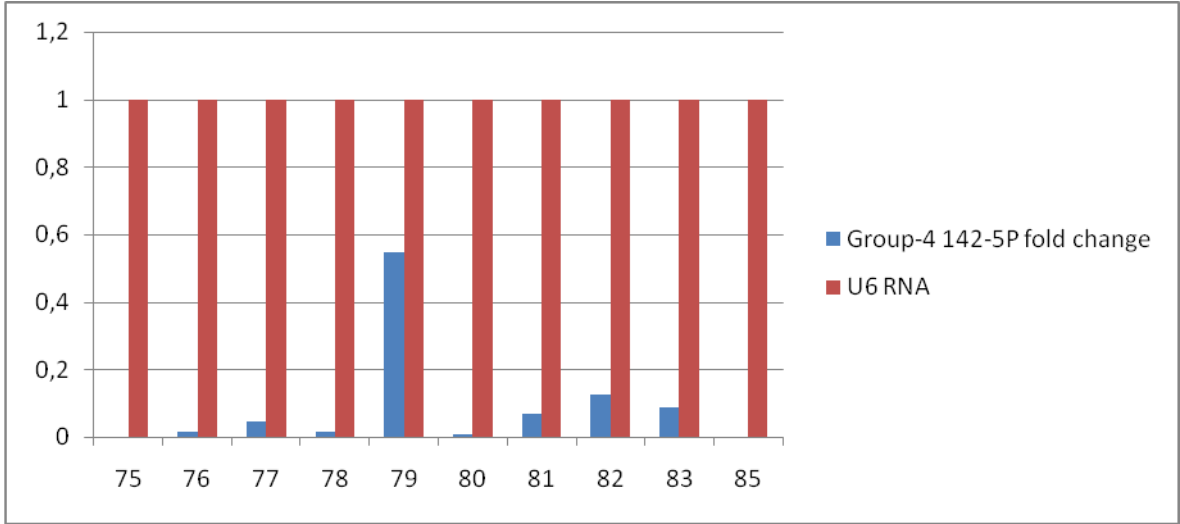
Şekil 4.5 6.grup örneklerinin miR-130a-3p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)



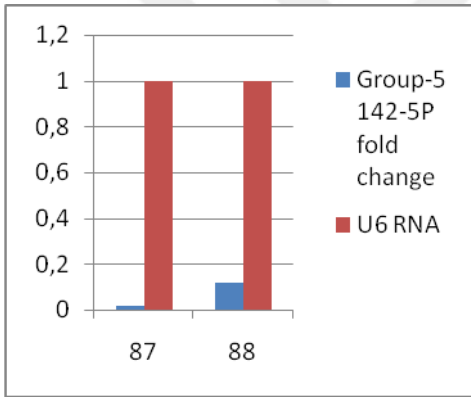
Şekil 4.6 2.grup örneklerinin miR-142-5p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)



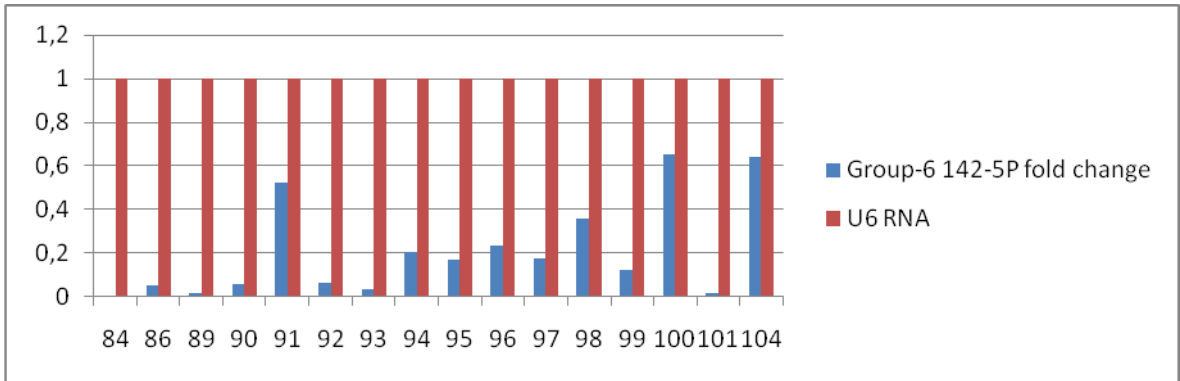
Şekil 4.7 3.grup örneklerinin miR-142-5p'nin logaritmik değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)



Şekil 4.8 4.grup örneklerinin miR-142-5p'nin logaritmik değışimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)



Şekil 4.9 5.grup örneklerinin miR-142-5p'nin logaritmik değışimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)



Şekil 4.10 6.grup örneklerinin miR-142-5p'nin logaritmik değışimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

5. TARTIŞMA

Kronik hepatit B enfeksiyonu tüm dünyada yaygın olarak görülen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kronik hepatit B'nin sık görülen komplikasyonlarından biri de sirozdur. Alkol, steatohepatit, otoimmün hastalıklar, kardiyak hastalıklar, genetik ve metabolik karaciğer hastalıkları nedeniyle de meydana gelebilen bu hastalık ölümcül komplikasyonlarla seyretmektedir. Tablo ikterik veya anikterik geçirilen akut enfeksiyon tablosunun ardından kronikleşmeye kadar geçen süreç içerisinde çoğu zaman fark edilmemekte ve dekompanse hale geldikten sonra tanımlanabilmektedir (Ökten 2003, Guyot ve ark 2006). Karaciğer dokusunda ileri derecede fibrozise rağmen asemptomatik tablo nedeniyle tanı aşaması gecikmekte ve splenomegali, asit, özefagus varis kanaması gibi portal hipertansiyon bulgularının görüldüğü ilerlemiş evrede tanı konulmaktadır. Bu aşamada kronik hepatit olarak değerlendirilen olguların karaciğer biyopsilerinde ileri derecede fibrozis (evre V,VI) hatta siroz saptanması; klinisyenleri tanı için erken evrede uyarabilen, uygulanabilirlik açısından basit, hızlı, ucuz ve güvenilir yeni yöntemlerin gereksinimini ortaya koymuştur (Mohamadnejad ve ark 2006).

Günümüzde karaciğerdeki fibrozisi göstermek için en sık kullanılan yöntem perkutan karaciğer biyopsisidir. İnvaziv bir yöntem olmasından dolayı uygulaması zor bir işlem olmakla birlikte uygulayan kişi, alınan biyopsi miktarı, incelemeyi yapan kişi gibi parametrelerden de etkilenir. Ayrıca kronik viral hepatitlerde karaciğerin her bölgesi aynı şekilde etkilenmediği için tek bir biyopsi örneğinin hastalığın özelliklerini ve fibrozisi her zaman yansıtamadığı düşünülmektedir (Kaya ve ark 2009).

Rutin uygulamalarda fibrozis derecesi ve karaciğer rezervini yansıtacak biyokimyasal parametrelerin kullanılabilirliği de araştırılmaktadır. Bu amaçla bilirubin, AST, ALT, ALP, GGT, albumin ve gamma-globulin, trombosit sayısı, protrombin zamanı ve aktivitesi, alfa-2 makroglobulin, haptoglobulin, apolipoprotein A1 gibi biyokimyasal parametreler kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda TGF- β 1, Tip 4 kollajen YKL-40, PDGF, CTGF, PVCP, MFAP, TIMP-1, MMP 1,2,9, hyalüronik asit, PIIINP gibi bazı laboratuvar ölçümlerinin, dokudaki fibrozis ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Afdhal ve Nunes 1999, Liu ve ark 2012). Bazı çalışmalarda, karaciğer biyopsisi biyokimyasal belirleyicilerle karşılaştırılmış ve histopatolojinin yanlış negatiflikleri de ortaya konulmuştur. Bu uyumsuzlukların karaciğer biyopsi tekniğinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Imbert-Bismut ve ark 2001, Poynard ve ark 2003, Poynard ve ark 2004).

Klinik uygulamalarda kronik hepatite bağı fibroziste tanı ve evreleme için kullanılan parametrelerin zahmetli, uygulanması güç, maliyetli olması, subjektif değerlendirmelere bağı farklılıkların görülmesi nedeniyle son yıllarda bu amaçla mikroRNA gibi serum ve dokudan bakılabilen bir biyomarkerin kullanımı ve uygulanabilirliği araştırılmaktadır.

MikroRNA'lar 19-23 nükleotid uzunluğunda posttranskripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen genlerdir. Yeni araştırmalarla miRNA'ların enerji üretimi, protein sentezi, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi farklı basamaklarda aldıkları roller belirlenmektedir. miRNA'ların farklı hücre tiplerinde ve dokulardaki varlığı ve görevlerine ait bilgilerin elde edilmesi ile bu moleküllerin değişik hastalıklar ile ilişkileri ortaya konmuştur. Serum ya da plazmada ölçülebilen miRNA'lar kanser tanı ve prognozunu belirlemede yeni biyomarkerlar olarak değerlendirilmiştir. miRNA'ların akciğer, prostat, kolorektal, over ve meme kanserlerinde serumda saptanıp tanı ve prognostik kriter olarak kullanılabilceğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Pedersen ve David 2008, Chen ve ark 2008, Mitchell ve ark 2008, Resnick ve ark 2009, Hu ve ark 2010, Huang ve ark 2010, Heneghan ve ark 2010, Fiorino ve ark 2016).

HBV ile miRNA arasındaki ilişkilerin aydınlatılması, enfeksiyonun moleküler düzeyde patogenezinin anlaşılması ve aşamalarının ortaya konması ile ivme kazanmıştır. Siroz hastalarında ve hepatoselüler karsinomlu olan hastalarda çeşitli miRNA'ların belirlenmesi ve düzey ölçümleri ile ilgili birçok araştırma yapılmış ve miRNA ekspresyon profilleri gözlenmiştir. Farklı miRNA'ların bu hastalıklarda biyomarker olarak kullanıma uygunluğu araştırılmış, tanı için yol gösterici özellikleri irdelenmiştir (Li ve ark 2010, Zhou ve ark 2011, Brunetto ve ark 2014, Jin ve ark 2015).

Tümör dokusu ve normal karaciğer dokusu incelenerek yapılan ve hepatoselüler karsinom miRNA ilişkisini araştıran çeşitli çalışmalarda farklı miRNA ekspresyon profilleri gözlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda miR-10b, miR-18, miR-20, miR-221, miR-222 ve miR-224'ün tümör dokusunda düzeyinin arttığı görülürken, miR-122, miR-145, miR-150, miR-199a, miR-199b, miR-200b, miR-214 ve miR-223'ün ise tümörlü dokuda düzeyinin azaldığı gözlenmiştir. Bu miRNA'ların her birinin hepatokarsinogenezde önemli rol oynadığı düşünölmüştür (Ladeiro ve ark 2008, Varnholt ve ark 2008, Kitab ve ark 2015).

Yapılan çalışmalarda, plazmada miR-106b ve miR-181b'nin karaciğer sirozu için serum miR-143 ve miR-215'in kronik hepatit B ve HCC için ve Let-7c, miR-23b, miR-122, miR-150 ve miR-122-5p, miR-192-5p' nin hepatit B virüs enfeksiyonu için biyomaker olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Chen ve ark 2012, Chen ve ark 2013, Brunetto ve ark 2014, Zhang ve ark 2014).

Jin ve ark.'nın yaptıkları araştırmada; miR-27a-3p'nin kronik hepatit B tespiti için, miR-1, miR-451a, miR-18a-5p, miR-29c-3p, miR-106b-5p ve miR-185-5p'nin sadece karaciğer sirozu tespiti için, miR-21-5p, miR-122-5p ve miR-146a' nın kronik hepatit B ve karaciğer sirozu tespiti için kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Jin ve ark 2015).

Öksüz ve ark., serumda miR30c-5p, miR223-3p, miR-302c-3p, miR-17-5p düzeylerinin HCV'ye bağlı siroz ve HCC'de down regule olduğunu göstermişler ve bu miRNA'ların sirozun ve HCC'nin erken evrelerinde belirteç biomarker olarak kullanılabileceğini düşünmüşlerdir (Öksüz ve ark 2015).

Giray ve ark. HBV'ye bağlı HCC'de miR-125b-5p ekspresyonunda artış, miR-223-3p ekspresyonunda azalma izlemişler; bu miRNA'ların hastalığın erken evre tanısında biyomarker olarak kullanılmasını önermişlerdir (Giray ve ark 2014).

Bu araştırmada makrofajlarda profibrogenezisin düzenlenmesinden sorumlu olduğu gösterilmiş olan miR-142-5p ve miR-130a-3p'nin serum düzeylerinin, kronik hepatit B'ye bağlı fibrozis tanısında ve evrelemesinde yol gösterici biyomarker olarak kullanılabilirliğini ve ileride bu miRNA'ların fibrozis sürecinin durdurulması ve hastalığın tedavisi için terapötik kullanımının mümkün olup olamayacağı hipotezini irdeledik.

Araştırmamızda, fibrozis evresine göre 6 gruba ayrılan hastaların real-time PCR sonucu elde edilen CT değerleri kullanılarak, örnekler arasındaki gen ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile karşılaştırıldı.

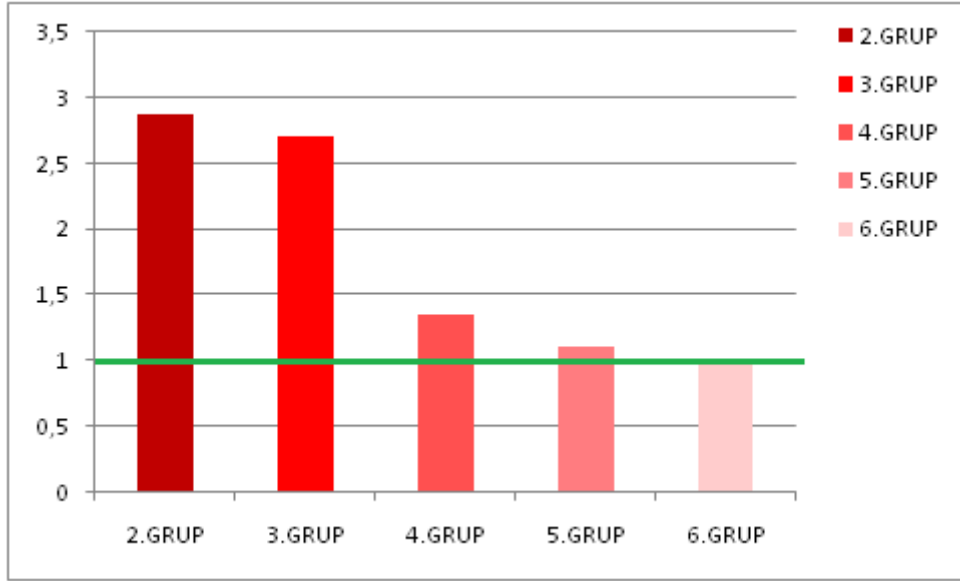
miR-130a-3p için grup 2,3,4,5 ve 6'da yer alan örneklerin ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri sırasıyla 2.87, 2.69, 1.34, 1.11 ve 1.01 olarak tespit edildi. Kontrol grubu olan grup 1 ile kıyaslandığında tüm gruplarda miR-130a-3p ekspresyon miktarında artış izlendi. Grup 2-6 kendi aralarında kıyaslandığında grup düzeyi arttıkça miR-130a-3p ekspresyon miktarında lineer azalma izlendi ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.0001$). Gruplar arasındaki istatistiksel analiz incelendiğinde grup 2 ve 6, grup 3 ve 6, grup 2 ve 4 arasındaki ekspresyon farkları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Grup 5'te yer alan hasta sayısı istatistiksel anlamı kısıtlayan bir durum olarak değerlendirildi.

miR-142-5p düzeyleri incelendiğinde grup 2,3,4,5 ve 6'da yer alan örneklerin ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri sırasıyla 1.17, 0.65, 0.09, 0.06 ve 0.22 olarak tespit edildi. Grup 2'de kontrol grubuna göre miR-142-5p ekspresyon miktarında artış; grup 3,4,5 ve 6'da ise azalma izlendi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

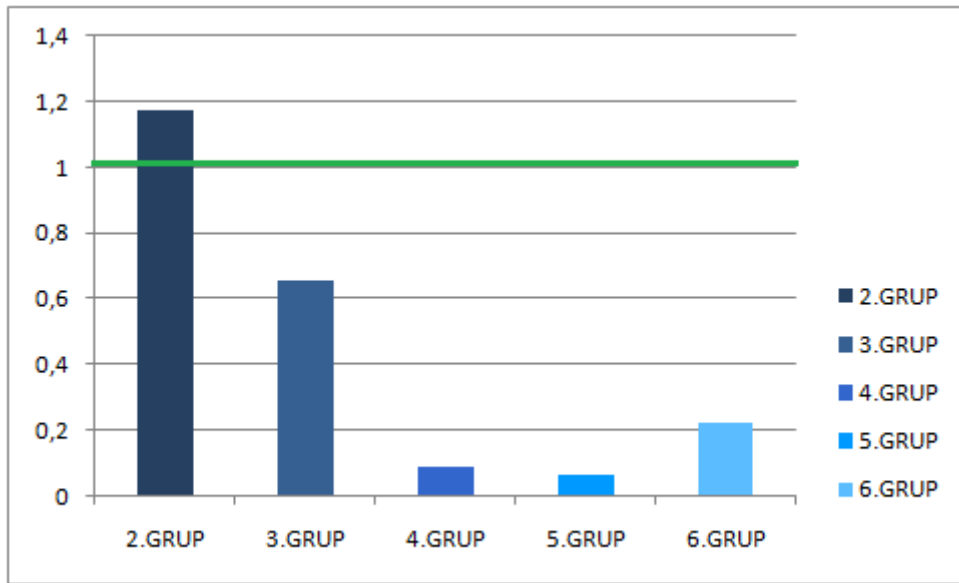
İmmünolojik süreçte STAT-6 fosforilasyon yolu üzerine etkisi ile fibrozis oluşumuna önemli katkısı bulunan miR-130a-3p ve miR-142-5p'nin, HBV'ye bağlı fibrozis gelişen hastalardaki ekspresyon seviyelerini araştıran çalışma sayısı kısıtlıdır. Bu miRNA'lar ile ilgili Su ve ark. kültüre edilmiş makrofajlar ve fareler üzerinde yaptıkları çalışmada karaciğer sirozu ve idiyopatik pulmoner fibroziste miR-142-5p seviyesinde artış, miR-130a-3p seviyesinde azalma izlemişler; miR-142-5p ve miR-130a-3p'nin kronik inflamasyonda makrofajların profibrojenik gen ekspresyonunu düzenlediğini rapor etmişlerdir (Su ve ark 2015). İnsanda gelişen fibrozis ve deneysel olarak hayvanlarda elde edilen fibrozisin moleküler mekanizması farklı olabilmekte ayrıca gelişim süresi bakımından da büyük farklılıklar göstermektedir. İnsanlarda bu süreç yıllar alırken hayvanlarda birkaç hafta gibi kısa bir sürede gerçekleşmektedir. Çalışmamız verileri ile kıyaslandığında miR-142-5p seviyesinde artış sadece grup 2'de görülmüş, diğer seviye değişiklikleri açısından benzerlik bulunmamış, farklılığın bu nedenlerle kaynaklanabileceği, miRNA ile ilgili çalışmalarda insan hücreleri ile yapılan araştırmaların daha güvenilir veri sağlayacağı düşünülmüştür.

İnsan karaciğer dokusunda miR-142-5p düzeyi ölçülerek yapılan bir çalışmada bu miRNA'nın HBV'ye bağlı HCC'li dokuda down regule olduğu gösterilmiş ve yaptığımız çalışma ile uyumlu bulunmuştur (Zhu ve ark 2012).

Wong ve ark'nın yaptığı çalışmada miR-142-5p; primer HCC dokusunda (T), venöz metastazda (VM) ve tümörsüz insan karaciğer dokusunda (NT) ölçülmüş, T/NT oranı 0.296, VM/NT oranı 0.202 hesaplanarak miR-142-5p düzeyindeki azalma gösterilmiş, bulgular bu araştırma sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Aynı çalışmada, miR-130a için T/NT oranı 0.260, VM/NT oranı 0.216 bulunmuştur. miR-130a düzeyinin tümörlü olan dokuda azaldığı ve hatta daha ileri evre olan venöz metatazda tümörlü dokuya göre daha da düşük düzeyde olduğu gösterilmiştir (Wong ve ark 2012).



Şekil 5.1 Gruplardaki miR-130a-3p ekspresyonunun referans RNA ile kıyaslanmış düzeyi



Şekil 5.2 Gruplardaki miR-142-5p ekspresyonunun referans RNA ile kıyaslanmış düzeyi

Bizim çalışmamızda da tümörlü dokuya işaret eden ileri evre fibrozis hastalarında (grup 5 ve 6) diğer gruplara göre miR-130a düzeyinde azalma saptanmış ve bu çalışma ile uyumlu bulunmuştur. Lu ve ark. birçok farklı kanser tipi ile yaptıkları çalışmada, tümör dokularında normal dokuya göre miRNA düzeylerinde global bir azalma saptamışlardır. Bu disregulasyonun mekanizması tam aydınlatılamamakla birlikte miRNA kodlanmasında görevli dicer, drosha, argonaute2 gibi komponentlerde azalma izlememişler, azalmada başka mekanizmaların rol aldığını düşünmüşlerdir. miRNA'ların hücre bölünmesini engelleme ve

hücre farklılaşmasındaki görevleri düşünüldüğünde, miRNA down regülasyonunun kanser oluşumunu açıklayabileceğini belirtmişlerdir (Lu ve ark 2005). Farklı insan kanser tiplerinde görülen TARBP2 (Transactivation- responsive RNA-binding protein) ve exportin 5 gibi mutasyonların miRNA maturasyonunu bozduğunu ve miRNA'da down regülasyona sebep olduğunu gösteren araştırmalar mevcut olup, bu mutasyonlar kanserde izlenen miRNA düzeyindeki azalmadan sorumlu tutulmuşlardır (Melo ve ark 2009, Melo ve ark 2010).

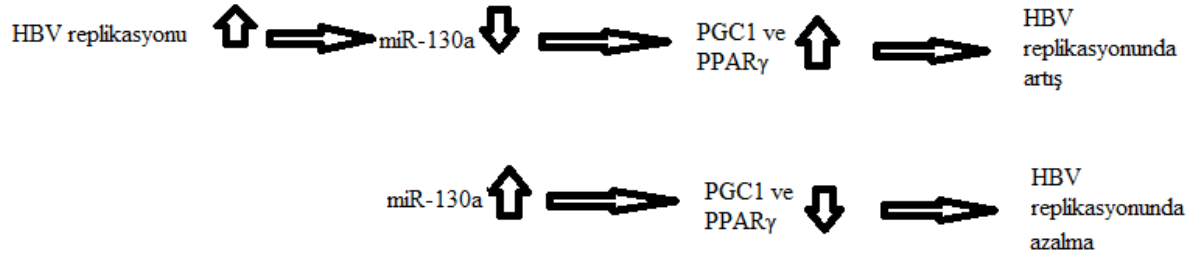
miRNA disregulasyonundan sorumlu tutulan farklı mutasyonlar, çalışmamızdaki miRNA düzeyindeki azalmaya eğilimi açıklayabilecek faktörlerden biri olabilir. Bunun ortaya konması için miR-142-5p ve miR-130a-3p gen bölgeleri ve sentez basamakları, mutasyon varlığı açısından ileri çalışmalarla incelenebilir.

Ura ve ark.'nın insan karaciğer doku örneklerinde yaptığı çalışmada, HBV'ye bağlı HCC'deki miR-142-5p düzeyinin HCV'ye bağlı HCC'ye göre oranı 0.40 bulunmuştur. Bu miRNA'nın sadece enfeksiyonla ilişkili değil, aynı zamanda tümör oluşumu ile ilişkili olduğu belirtilmiş, sonucun HBV ve HCV'ye bağlı HCC oluşumlarının farklı mekanizmalarla geliştiğini belirtmede önemli olduğu söylenmiştir. miR-130a'nin HCC'li hastalarda kronik hepatitli (KH) hastalara göre düzeyinin azaldığı bulunmuş, HCC/KH oranı 0.50 olarak tespit edilmiştir. Kronik hepatitin kötü prognoz göstermesi ile ilerleyen aşamalarında görülen HCC'deki miR-130a ekspresyonunun azalması bizim çalışmamız ile uyumlu bulunmuştur (Ura ve ark 2009).

Kan örneklerinden miR-130a-3p düzeyi ölçülerek yapılan çalışmada kronik hepatit B'li hastalarda kontrol grubuna göre 8.60 kat artış bulunmuştur (Öksüz ve ark 2015).

Huang ve ark. human hepatoblastoma HepG2 hücrelerinde yaptıkları deneylerde miR-130a'nın peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 α) ve PPAR γ yolu ile HBV DNA replikasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Bu nedenle miR-130a'nın terapötik olarak kullanılabilirliğinin araştırılması gerektiğini düşünmüşlerdir. Diğer bir yandan PGC1 α ve PPAR γ 'nın HBV replikasyonunu uyarıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiş, miR-130a'nın PGC1 α ve PPAR γ 'yı aynı anda hedef alarak metabolik homeostazı sağlamakta görev aldığı bildirilmiştir. HBV replikasyonunun, miR-130a düzeyinde azalmaya yol açarak ve PGC1 α ve PPAR γ 'yı yükselterek viral replikasyonu belirgin bir şekilde artırabildiği belirtilmiştir. Hepatik inflamasyon (hepatit) sırasında NF- κ B/p65 aktivasyonunun, miR-130a seviyesinde artışa neden olarak sonrasında PGC1 α , PPAR γ düzeyinin ve HBV replikasyonun azaldığı ve bu durumun viral klirens katkıda bulunduğu söylenebilir. Bir başka açıdan birçok asemptomatik ve persistan HBV taşıyıcısındaki HBV replikasyonunun, miR-130a'da azalmaya yol açtığı ve

NF-κB baskılanması ile inflamasyonda azalma ve immun toleransa neden olup viral klirensi de azalttığı söylenmiştir. miR-130a'nın bu konudaki rolünü aydınlatmak için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır (Huang ve ark 2015).



Şekil 5.3 HBV, miR-130a, PGC1 ve PPARγ etkileşimleri

HBV DNA seviyeleri ve fibrozis arasındaki ilişki; ALT, AST seviyeleri, HBeAg pozitifliği, yaş gibi farklı faktörlerden etkilenmektedir. HBV DNA seviyeleri ve karaciğer biyopsilerindeki histopatolojik bulgular arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışmada serum HBV DNA düzeyleri ve nekroinflamasyon düzeyleri, fibrozis skorları arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (Chan ve ark 2002, Yuen ve ark 2004, Nabuco ve ark 2007).

Biazar ve ark.'nın yaptığı çalışmada, kronik hepatit B'li hastalarda karaciğer dokusundaki viral yük ile yapılan biyopside karaciğer hasarının evresi arasında belirgin bir korelasyon saptanmış, karaciğer dokusundaki viral yük tayininin önemi vurgulanmıştır. Serum HBV düzeyleri ile karaciğer dokusundaki HBV düzeyleri arasında ilişki bulunmamıştır (Biazar 2015).

Fibrozis mekanizması, HBV replikasyonu ve miRNA'lar arasındaki karşılıklı etkileşim oldukça karmaşık ve çok yönlü olup; birçok sitokin, farklı yolak gibi çok sayıda immün sistem komponentinden etkilendiği bilinmektedir. Çalışmamızda kronik hepatitli hastalardaki miR-130a-3p düzeylerindeki artış bu sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur. Düzeyinin erken evrelerde diğer evrelere göre yüksek bulunması, akut evrede NFκB/p65 aktivasyonu ve HBV DNA replikasyonunu baskılamak amaçlı fazla ekspresyonuna bağlı olabilir. İleri evrelere doğru akut yanıtın azalması ile miR130a-3p düzeyinde göreceli azalma izlendiği; yine de yüksek bulunan düzeylerin PGC1α ve PPARγ'da azalmaya yol açarak HSC'leri uarması ile fibrozise katkıda bulunduğu düşünülmüştür. İzlenen düzey azalmasının HBV'nin replikasyonunun devamına bağlı da olabileceği, bunun ortaya

konabilmesi için özellikle doku HBV DNA düzeyleri ile birlikte bir karşılaştırma yapılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

TGF β 'nın HSC aracılı fibrogenezde en potent uyarı sağlayan sitokin olduğu bildirilmiştir. HSC aktivasyonunun da TGF β ekspresyonu üzerinde uyarıcı etkisi olduğu, bu sayede fibrotik sürecin sürekli aktif halde kalabildiği gösterilmiştir. TGF β reseptörlerinin inhibisyonunun hepatik stellate hücre (HSC) aktivasyonuna son verdiği gösterilmiştir (Nakamura 2000, Ueno 2000, Kanzler 2001).

Bu bulgular TGF β aracılı HSC aktivasyonunun ve kollagen yapımının fibrozis sürecindeki önemini göstermiştir. Bununla birlikte TGF β inhibisyonu ile HSC aktivasyonunun engellenmesinin, fibrozisin geri dönüşümü (reverse fibrozis) ve iyileşme mekanizmalarında gerekli olduğunu düşündürmüştür (Lakner 2012).

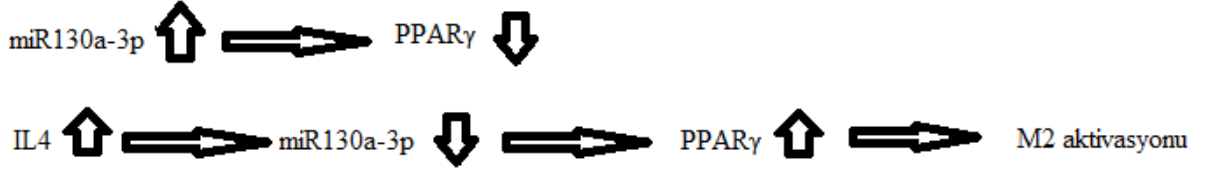
Yaptığımız çalışmada bu miRNA'ların her fibrozis evresindeki ekspresyon farklarını belirlerken, izlenen bu farkların hastaların fibrozis evresi hakkında bilgi verme amacıyla biyomarker olarak kullanılabilirliğini de inceledik.

İmmünolojik süreçte rol oynayan birçok sitokin arasında denge olduğu ve inflamatuvar yanıtın bu sayede kendi içinde düzenleyici bir mekanizmaya sahip olduğu bilinmektedir. Hepatik hasarı takiben gelişen inflamatuvar yanıtta farklı fenotipteki makrofaj popülasyonlarının rolü incelenmiştir. İnterferon- γ (IFN- γ), tümör nekrozis faktör (TNF) gibi proinflamatuvar sitokinlerin erken evrede M1 makrofajlarını uyardığı, bu makrofajların erken inflamatuvar yanıtı artırarak konak savunmasında önemli rol oynadığı görülmüştür. Doku hasarını takip eden inflamatuvar yanıtın hem normal hem patolojik yara iyileşmesinde önemli rolü vardır (Mantovani ve ark 2004, Lech ve Anders 2013).

İnflamasyonun akut fazından sonra, M2 makrofajları uyarmak üzere IL 4 ve IL13 gibi antiinflamatuvar Th2 sitokinlerinin salındığı ve fibrozisin geç evrelerinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu yol ile makrofajlar alternatif yoldan uyarılırken, M2 makrofajlar antiinflamatuvar bir çevre yaratarak iyileşme süreci ve yaraların rejenerasyonunu sağlarlar. Ancak lezyon persistan ve uyarıcı devamlı ise M2 makrofajlar profibrotik bir rol üstlenip TGF β ve galaktin-3 gibi ekstraselüler matriks proteinlerinin yapımını uyarıcı profibrotik faktörler salgırlar (Laskin ve ark 2011, Lech ve Anders 2013, Braga ve ark 2015, Su ve ark 2015). Böylece, dengenin M1 yönüne kayması ile sitotoksikite ve doku hasarı, M2 yönüne kayması ile fibrozis ve kanser gelişimi izlenir (Mantovani ve ark 2004, Laskin ve ark 2011).

Su ve ark.'nın yaptığı çalışmada IL4 ve IL13'ün miRNA düzeyi üzerine etki edebildiği belirtilmiştir. M2 aktivasyonunun PPAR γ ile uyarıldığı, miR-130a-3p'nin ise

PPAR γ düzeyinde azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. IL4'ün miR-130a-3p seviyesinde azalmaya yol açarak PPAR γ düzeyinde artışa neden olduğu, sonuçta M2 sinyalinin devamının sağlandığı, hepatik makrofajların fibroblastları aktive etmesiyle siroz oluştuğu belirtilmiştir. STAT6 fosforilasyonu ve PPAR γ 'da izlenen bu artışa TGF β 1 artışının da eşlik ettiği gösterilmiştir (Su ve ark 2015).



Şekil 5.4 IL-4, miR-130a-3P, PPAR γ ve M2 etkileşimleri

Yaptığımız çalışmada miR-130a-3p'nin tüm gruplarda görülen artışı ve daha sonraları fibrozis evrelerinde göreceli azalışının bu durum ile açıklanabileceği düşünülmüştür. miR-130a-3p'nin ileri evre karaciğer hasarı bulunan hastalarda terapötik olarak M2 makrofajların uyarımını engelleme ve fibrozis oluşumunu durdurma amaçlı kullanılabileceği düşünülmüş, bu konuyla ilgili deneysel araştırmaların yapılması gerektiği fikrine varılmıştır.

TGF β 1 ve IL4'ün miR-130a ve miR-130b ekspresyonu üzerindeki zıt etkileri ortaya konmuştur. Çalışmamızda saptanan miR-130a-3p düzeyleri arasındaki farklılığın, farklı evrelerdeki inflamasyon sürecinde farklı düzeylerde bulunan bu sitokinlerin etkisiyle oluştuğu ve fibrozis sürecini kontrol etmede önemli rol oynadığı düşünülmüştür. Erken evrelerde görülen miR-130a-3p düzeyindeki yüksekliğin fibrozis sürecinde primer anahtar rolü olan HSC'nin ESM üretimini desteklemek amaçlı gerçekleşebildiği, sonralardaki düşüşün ise özellikle geç evre fibroziste rol oynayan Th2 sitokinleri ile aktive olan makrofajların aktivasyonuna işaret edebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle HBV'ye bağlı fibrozisli hastalarda miR-130a-3p'nin belirli aralıklarla serumda ölçülerek yapılacak düzey takiplerinin, hastaların karaciğer fibrozis düzeyindeki değişim hakkında fikir verebileceği düşünülmüştür. miR-142-5p'nin fibrosis 2 de kontrol grubuna göre artması daha ileri evrelerde ise düşüş göstermesi kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda fibrozis için uyarıcı olabilmekle birlikte evreler arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması, bu miRNA'nın fibrozis evrelemesi için düzey ölçümlerinin faydalı olmayacağını göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kronik viral hepatite bağlı fibroziste, tanı belirteçi ve tedavi hedef olarak miR-142-5p ve miR-130a-3p miRNA'larının kullanılabilirliğini araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalında 1.Ocak.2015-1.Aralık-.2016 tarihleri arasında kronik hepatit B tanısı alarak histopatolojik tanı için perkutan karaciğer biyopsisi yapılan toplam 92 hasta çalışmaya alınmıştır.

1. Karaciğer biyopsileri modifiye İshak skoruna göre değerlendirilerek 18 hasta fibrozis evre 1, 28 hasta fibrozis evre 2, 18 hasta fibrozis evre 3, 10 hasta fibrozis evre 4, 2 hasta fibrozis evre 5 ve 16 hasta fibrozis evre 6 olarak tespit edilmiştir; bu hastalar evre numaralandırmalarına uyumlu şekilde grup1-6 içerisinde sınıflandırılmıştır.
2. Hastaların serum miR-142-5p ve miR-130a-3p düzeyleri Real-time PCR metodu ile ölçülmüştür. Grup 1’de yer alan hastalar kontrol grubu olarak belirlenerek, gruplar arasındaki gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Kantitatif PCR metodu veri analizi için Rao ve ark. tarafından önerilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılmıştır. Gruplar arası $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri farkı ANOVA yöntemi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.
3. miR-130a-3p için grup 2,3,4,5 ve 6’da yer alan örneklerin ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri sırasıyla 2.87, 2.69, 1.34, 1.11 ve 1.01 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu olan grup 1 ile kıyaslandığında tüm gruplarda miR-130a-3p ekspresyon miktarında artış izlenmiştir. Grup 2-6 kendi aralarında kıyaslandığında grup düzeyi arttıkça miR-130a-3p ekspresyon miktarında lineer azalma izlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$).
4. miR-142-5p düzeyleri incelendiğinde grup 2,3,4,5 ve 6’ da yer alan örneklerin ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri sırasıyla 1.17, 0.65, 0.09, 0.06 ve 0.22 olarak tespit edilmiştir. Grup 2’de kontrol grubuna göre miR-142-5p ekspresyon miktarında artış; grup 3,4,5 ve 6’da ise azalma izlenmiştir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).
5. HBV’ye bağlı fibrozisli hastalarda miR-130a-3p’nin belirli aralıklarla serumda ölçülerek yapılacak düzey takiplerinin, hastaların karaciğer fibrozis düzeyindeki değişim hakkında fikir verebileceği düşünülmüştür.
6. miR-142-5p’nin fibrozis 2’ de kontrol grubuna göre artması daha ileri evrelerde ise düşüş göstermesi kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda fibrozis için uyarıcı

olabileceğini, evreler arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması, bu miRNA'nın düzey ölçümlerinin fibrozis evrelemesi için faydalı olmayacağını düşündürmüştür.



7. KAYNAKLAR

- Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol.* 1999;6:1160–74.
- Ağca H. Hepatit B serolojisi. In: Altındış M, Tabak F, editors. *Hepatit Mikrobiyolojisi.* İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi. 2015. p. 76-82.
- Akhan S, Aynioğlu A, Çağatay A, Gönen İ, Günel Ö, Kaynar T, et al. Kronik Hepatit B Virusu İnfeksiyonunun Yönetimi: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Viral Hepatit Çalışma Grubu Uzlaş Raporu. *Klinik Dergisi* 2014; 27(Özel Sayı 1): 2-18.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Visonâ KA, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small gene. *JID.* 1997;176:851-858.
- Badur S. Hepatit A, B ve D virüsleri. In: Us D, Ergünay K, editors. *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji.* Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. 2012. p. 296-331.
- Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB. miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *J Hepatol.* 2015;62(2):448-57.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001;409:363-366.
- Biazar T, Yahyapour Y, Hasanjani Roushan MR, Rajabnia R, Sadeghi M, Taheri H, et al. Relationship between hepatitis B DNA viral load in the liver and its histology in patients with chronic hepatitis B . *Caspian Journal of Internal Medicine.* 2015;6(4):209-212.
- Braga TT, Agudelo JSH, Camara NOS. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Frontiers in Immunology.* 2015;6:602.
- Brunetto MR, Cavallone D, Oliveri F, Moriconi F, Colombatto P, Coco B, et al. A Serum MicroRNA Signature Is Associated with the Immune Control of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *PLoS ONE.* 2014; 9(10), e110782.

- Brenner DA. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2009;120:361–368.
- Chan HL, Tsang SW, Liew CT, Tse CH, Wong ML, Ching JY, et al. Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:406-412.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008 Oct;18(10):997-1006.
- Chen Y, Li L, Zhou Z, Wang N, Zhang CY, Zen K. A pilot study of serum microRNA signatures as a novel biomarker for occult hepatitis B virus infection. *Med Microbiol Immunol.* 2012 Aug;201(3):389-95.
- Chen YJ, Zhu JM, Wu H, Fan J, Zhou J, Hu J, et al. Circulating microRNAs as a Fingerprint for Liver Cirrhosis. *PLoS One.* 2013;8(6):e66577.
- Coşkun Ö, Savaşçı Ü, Eyigün CP. Current treatment strategies in hepatitis B virus infections. *Anatol J Clin Investig.* 2012;6(4):299-310.
- Dhanasekaran R, Limaye A, Cabrera R. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis, and therapeutics. *Hepatic Medicine: Evidence and Research.* 2012;4:19-37.
- Doğan M. Kronik Hepatit B’de Lamivudin Direnci ve Lamivudin Direnci Gelişimi Üzerine Etkili Faktörler (uzmanlık tezi). İstanbul: S.B. İstanbul Eğitim Ve Araştırma Hastanesi; 2007.
- EASL Jury. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002: Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version). *J Hepatol.* 2003 Apr;38(4):533-40.
- Fiorino S, Bacchi-Reggiani ML, Visani M, Acquaviva G, Fornelli A, Masetti M, et al. MicroRNAs as possible biomarkers for diagnosis and prognosis of hepatitis B- and C-related-hepatocellular-carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2016;22(15):3907-36.

- Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2004;1(2):98-105.
- Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, Ulger M, Serin MS, Sezgin O, et al. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2014;41:4513-4519.
- Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol*. 2007 Oct;47(4):598-607.
- Güçlü E, Geyik MF. Hepatit B Enfeksiyonu ve Korunma, *Konuralp Tıp Dergisi*. 2012;4(2):54-58.
- Guo CJ, Pan Q, Cheng T, Jiang B, Chen GY, Li DG. Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways. *FEBS J*. 2009;276:5163–5176.
- Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Sage PB, Balabaud C et al. Hepatic fibrosis and cirrhosis: The (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38:135–51.
- Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg*. 2010 Mar;251(3):499-505.
- Hepatitis B virus: epidemiology and transmission risks (updated May 2016). EMI Guidelines. <http://www.hpsc.ie/a-z/EMIToolkit/appendices/app21.pdf> erişim tarihi: (28.04.2017).
- Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1721-6.
- Huang CF, Sun CC, Zhao F, Zhang YD, Li DJ. miR-33a levels in hepatic and serum after chronic HBV-induced fibrosis. *J Gastroenterol*. 2015;50:480–490.
- Huang JY, Chou SF, Lee JW, Chen HL, Chen CM, Tao MH, Shih C. MicroRNA-130a can inhibit hepatitis B virus replication via targeting PGC1 α and PPAR γ . *RNA*. 2015;21(3):385-400.

- Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2010;127(1):118-26.
- Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T: MULTIVIRC Group Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet*. 2001; 357: 1069-75.
- Inan N. Hepatit B Virus Biyolojisi. In: Altındaş M, Tabak F, editors. *Hepatit Mikrobiyolojisi*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi. 2015. p. 52-66.
- Israelow B, Mullokandov G, Agudo J, Sourisseau M, Bashir A, Maldonado AY, Dar AC, Brown BD, Evans MJ. Hepatitis C virus genetics affects miR-122 requirements and response to miR-122 inhibitors. *Nat Commun*. 2014;18(5):5408.
- Jin BX, Zhang YH, Jin WJ, Sun XY, Qiao GF, Wei YY, et al. .MicroRNA panels as disease biomarkers distinguishing hepatitis B virus infection caused hepatitis and liver cirrhosis. *Sci Rep*. 2015;5:15026.
- Kanzler S, Meyer E, Lohse AW, Schirmacher P, Henninger J, Galle PR, et al. Hepatocellular expression of a dominant-negative mutant TGF-beta type II receptor accelerates chemically induced hepatocarcinogenesis. *Oncogene*. 2001;20:5015–5024.
- Kaya O, Akçam FZ, Sönmez Y, Tıǧlı A, Çiriş M, Kronik Hepatit B ve C Enfeksiyonlarında Fibrozisi Göstermede Non-invaziv Yöntemlerin Değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Dergisi*. 2009; 14(3):91-97.
- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol*. 2002;83:1267-80.
- Kitab B, Alj HS, Ezzikouri S, Benjelloun S. MicroRNAs as Important Players in Host-hepatitis B Virus Interactions. *Journal of Clinical and Translational. Hepatology*. 2015;3(2):149-161.
- Kitano M, Bloomston PM. Hepatic Stellate Cells and microRNAs in Pathogenesis of Liver Fibrosis. *J Clin Med*. 2016 Mar 16;5(3).

- Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology*. 2008;47(6):1955-63.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294:853–858.
- Lakner AM, Steuerwald NM, Walling TL, Ghosh S, Li T, McKillop IH, et al. Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis. *Hepatology*. 2012 Jul;56(1):300-10.
- Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:267-88.
- Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jul;1832(7):989-97.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843–854.
- Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, Chen X, Liu FY, Zhang JF, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer Res*. 2010;70(23):9798-807.
- Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2009;373:582–92.
- Li C, Hu J, Hao J, Zhao B, Wu B, Sun L. et al. Competitive virus and host RNAs: the interplay of a hidden virus and host interaction. *Protein & Cell*, 2014; 5(5), 348–356.
- Liu T, Wang X, Karsdal MA, Leeming DJ, Genovese F. Molecular Serum Markers of Liver Fibrosis. *Biomarker Insights*. 2012;7:105-117.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834-8.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*.

2004;25(12):677-86.

Melo SA, Moutinho C, Ropero S, Calin GA, Rossi S, Spizzo R, et al. A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell*. 2010;18:303-315.

Melo SA, Ropero S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA, et al. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet*. 2009;41:365-370.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(30):10513-8.

Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of HCC: Consider the Population. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2013;47(0):2-6.

Mohamadnejad M, Montazeri G, Fazlollahi A, Zamani F, Nasiri J, Nobakht H et al. Noninvasive markers of liver fibrosis and inflammation in chronic hepatitis B-Virus related liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:2537-45.

Moraes MT, Gomes SA, Niel C. Sequence analysis of pre S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brasil. *Arch Virol*. 1996;141:1763-1767.

Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, et al. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One*. 2011;24;6(1):e16081.

Nabuco LC, Villela-Nogueira CA, Perez RM, Ceci L, Pannain VL, Nogueira CM, et al. HBV-DNA levels in HBsAg-positive blood donors and its relationship with liver histology. *J Clin Gastroenterol*. 2007;41:194-198.

Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine- treated rats. *Hepatology*. 2000;32:247-255.

Oksuz Z, Serin MS, Kaplan E, Dogen A, Tezcan S, Aslan G, et al. Serum microRNAs; miR-30c-5p, miR-223-3p, miR-302c-3p and miR-17-5p could be used as novel

- non-invasive biomarkers for HCV-positive cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2015;42(3):713-20.
- Ökten A. Türkiye’de Kronik Hepatit, Siroz ve Hepatosellüler Karsinoma Etiyolojisi. *Güncel Gastroenteroloji.* 2003;7(3):187-91.
- Onan E. Karaciğer Spesifik Mikro-RNA 122’nin Hepatoselüler Karsinomadaki Yeri ve Önemi (Uzmanlık Tezi). Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2012.
- Pedersen I, David M. MicroRNAs in the immune response. *Cytokine.* 2008;43(3):391-4.
- Poynard T, McHutchison J, Manns M, Myers RP, Albrecht J. Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. *Hepatology.* 2003; 38: 481-92.
- Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le Calvez S, et al. Prospective analysis of discordant results between biochemical markers and biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem.* 2004;50(8):1344-55.
- Purcell RH. The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology.* 1993;104:955-963.
- Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013;3(3):71-85.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403, 901–906.
- Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol.* 2009 Jan;112(1):55-9.
- Robinson WS. Hepatitis B virus and Hepatitis D virus. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases* 4.th Ed. USA: Churchill-Livingstone. 1995. p. 1406–1439.
- Robinson WS: Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. Eds: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE. *Principles and Practice of Infectious Disease.* 5 th

- ed, New York. Churchill Livingstone, 2000; 1652-85.
- Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*. 2011;53:209–218.
- Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 2001; 294: 797–799.5.
- Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser, *Dicle Tıp Dergisi*. 2011; 38 (1): 113-120.
- Şengönül A. Hepatit B Virus DNA Polimeraz Geni Mutasyonlarının Saptanması. (doktora tezi). İzmir: T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.
- Sonsuz A. Kronik Hepatit B ve C. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Sempozyum Dizisi. 2007; s. 79-90.
- Soyuer I. Kronik viral hepatitlerin patolojisi. Erişim tarihi: 25.04.2017 www.vhsd.org/files/file/2009_sunumlar/279.pdf
- Su S, Zhao Q, He C, Huang D, Liu J, Chen F, et al. miR-142-5p and miR-130a-3p are regulated by IL-4 and IL-13 and control profibrogenic macrophage program. *Nat Commun*. 2015;6:8523.
- Taş T. Salt Anti Hepatit B Virus Core Antikoru Pozitif Kan Donörlerinde Hepatit B Virus DNA Tespiti (uzmanlık tezi). Isparta: T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi; 2009.
- Tucer D. Kronik Viral Hepatitli Hastalarda Non-invaziv Serum Belirteçlerinin Karaciğer Fibrozis Derecesini Belirlemedeki Rollerini. (yandal uzmanlık tezi). Edirne: T.C. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2008.
- Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Astuchi N, Takeshita A, et al. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther*. 2000;11:33–42.
- Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, et al. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease

- progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009 Apr;49(4):1098-112.
- Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B Virusunun Moleküler Virolojisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E, editors. *Viral Hepatit 2007*. 1. baskı. İstanbul: Ohan Matbaası. 2007. p. 96-107.
- Varkonyi-Gasic E, Hellens RP. Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods Mol Biol*. 2011;744:145-57.
- Varnholt H, Drebbler U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, et al. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47(4):1223-32.
- Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, Li Y, Wang SS, Torok NJ, et al. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298:101–106.
- WHO: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
- Wong CM, Wong CC, Lee JM, Fan DN, Au SL, Ng IO. Sequential alterations of microRNA expression in hepatocellular carcinoma development and venous metastasis. *Hepatology*. 2012 May;55(5):1453-61.
- Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, et al. Circulating microRNAs, mir-21, mir-122, and mir-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog*. 2011;50:136–42.
- Yuen MF, Ng IO, Fan ST, Yuan HJ, Wong DK, Yuen JC, et al. Significance of HBV DNA levels in liver histology of HBeAg and Anti-HBe positive patients with chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:2032-2037.
- Yula E, Kaya S. microRNA ve Hepatit B virus. In: Altındış M, Tabak F, editors. *Hepatit Mikrobiyolojisi*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi. 2015. p. 139-158.
- Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, Guo H, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem*. 2010;56:1830–8.

Zhang ZQ, Meng H, Wang N, Liang LN, Liu LN, Lu SM, et al. Serum microRNA 143 and microRNA 215 as potential biomarkers for the diagnosis of chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol.* 2014;9:135.

Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2011;29(36):4781-8.

Zhu HT, Dong QZ, Sheng YY, Wei JW, Wang G, Zhou HJ, et al. MicroRNA-29a-5p is a novel predictor for early recurrence of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after surgical resection. *PLoS One.* 2012;7(12):e52393.

