

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

HCV ile ENFEKTE HASTALARDA GENOTİP TAYİNİ YAPILMASI ve
miRNA DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. SANİYE KÜÇÜKAKIN YAKA

DANIŞMAN
DOÇ. DR. AHMET ÇALIŞKAN

DENİZLİ 2025

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

HCV ile ENFEKTE HASTALARDA GENOTİP TAYİNİ
YAPILMASI ve miRNA DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. SANİYE KÜÇÜKAKIN YAKA

DANIŞMAN

DOÇ. DR. AHMET ÇALIŞKAN

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 27.10.2022 tarih ve 2022TIPF027 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ 2025

Doç. Dr. Ahmet ÇALIŞKAN danışmanlığında Dr. Saniye KÜÇÜKAKIN YAKA tarafından yapılan “HCV ile Enfekte Hastalarda Genotip Tayini Yapılması ve miRNA Düzeylerinin Araştırılması” başlıklı tez çalışması 04/02/2025 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

ÜYE

ÜYE

**Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.
04/02/2025.**

Prof. Dr. Osman İsmail ÖZDEL

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadarki süreçte vaktini ve bilimsel desteğini sunan değerli danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Ahmet ÇALIŞKAN'a;

Tıbbi Mikrobiyoloji alanında yetişmemde katkıda bulunan, uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. İlknur KALELİ'ye ve değerli hocalarım Prof. Dr. Melek DEMİR, Prof. Dr. Çağrı ERGİN, Doç. Dr. Ergun METE, Doç. Dr. Sedef Zeliha ÖNER, Doç. Dr. Mustafa ŞENGÜL'e;

Asistanlığım boyunca beraber olduğumuz tüm asistan arkadaşlarım ve anabilim dalı çalışanlarımıza;

Tüm hayatım boyunca yanımda olan ve beni bugünlere getiren sevgili aileme;

Tüm zorluklara rağmen tezime ve hayatımıza neşe katan oğlum Çınar YAKA'ya;

Bu uzun süreç boyunca her zaman yanımda olan, her zorluğu birlikte atlattığımız, gücüme güç katan canım eşim Mutlu YAKA'ya;

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM...

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLO DİZİNİ.....	XII
ÖZET.....	XIII
SUMMARY	XV
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	4
Hepatit C Virüs.....	4
Tarihçe	4
HCV Yapısı ve Genomu	4
HCV Replikasyonu	7
İmmunopatoloji.....	8
Epidemiyoloji	9
Genotip.....	11
Bulaş Yolları.....	13
Klinik.....	15
Laboratuvar Tanı Yöntemleri	18
miRNA	22
miRNA biyogenezi	23
Belirteç Olarak miRNAlar	24
GEREÇ VE YÖNTEM	27
HASTALAR ve KONTROL GRUBU	27
ANTI HCV TESTİ	28
KANTİTATİF HCV RNA TESTİ	28
HCV GENOTİP TAYİNİ	30
KONTROL GRUBU TOTAL RNA EKSTRAKSİYONU	31
miRNA için cDNA SENTEZİ	32
miRNA için GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	33

İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	35
BULGULAR.....	36
HCV GENOTİPLERİNİN DAĞILIMI.....	36
HASTALARIN GENOTİPLERİNE GÖRE CİNSİYET YAŞ ve LABORATUVAR BULGULARI	36
KONTROL ve HASTA GRUPLARININ DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ	38
KONTROL ve HASTA GRUPLARININ LABORATUVAR BULGULARI.	38
miRNA EKSPRESYONLARININ KONTROL ve HASTA GRUPLARI ARASINDAKİ DEĞİŞİMİ	39
HASTA GRUBUNDA MiRNA EKSPRESYONLARI ile LABORATUVAR BULGULARI ARASINDAKİ İLİŞKİ	41
PARAMETRELERİN LOJİSTİK REGRESYON ANALİZİ ile İNCELENMESİ.....	42
ROC ANALİZİ	44
HASTALARIN GENOTİPLERİNE GÖRE MiRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİ	45
TARTIŞMA	48
SONUÇLAR	60
KAYNAKÇA	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFP: Alfa-fetoprotein

Ago: Argonaute proteini

ALP: Alkalen fosfataz

ALT: Alanin aminotransferaz

AO: Aritmetik ortalama

AST: Aspartat aminotransferaz

bDNA: Branched DNA, dallı DNA

C protein: Nükleokapsid proteini, kor protein, core protein

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

cDNA: Tamamlayıcı DNA

CD81: Cluster of differentiation 81

circRNA: Dairesel RNA

CLIA: Kemilüminesans İmmün Analiz

CMIA: Kemilüminesans Mikropartikül İmmün Analiz

CTL: Sitotoksik T lenfosit

ÇAA: Çeyrekler arası aralık

D: Domain

DCGR8: DiGeorge syndrome critical region 8

DNA: Deoksiribonükleik asit

EAA: Eğri altı alan

E1: Envelope 1, zarf 1

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EIA: Enzim immün analiz

ELISA: Enzim bağlantılı immünosorbent analiz

FDA: Food and Drug Administration

GA Güven aralığı

GAGs: Glikozaminoglikanlar

HAV: Hepatit A virüs

HBV: Hepatit B virüs

HCV: Hepatit C virüsü

HCV-cAg: HCV kor antijen

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü

HSK: Hepatoselüler karsinom

HVR: Hypervariable region

IFN: İnterferon

IRAK1: İnterlökin-1 reseptörüyle ilişkili kinaz 1

IU: İnternational unit, uluslararası birim

LDL-R: Düşük dansiteli lipoprotein reseptör

LIA: Line immün analiz

lncRNA: Uzun kodlanmayan RNA

mL: Mililitre

mRNA: Mesajcı RNA

miRNA: Mikro ribonükleik asit

MyD88: Miyeloid farklılaşma faktörü 88

NCR: Non-coding region

ncRNA: Non-coding RNA

NF- κ B: NF-kappa B, Nuclear Factor kappa B

NK: natürel killer

NS5B: Yapısal olmayan 5B, nonstructural 5B

ORF: Açık okunur bölge

OR: Odd's oranı

PAK4: p21-Activated kinase4

PDK1: Fosfatidilinozitol bağımlı kinaz 1

piRNA: PIWI etkileşimli RNAlar

pre-miRNA: Öncü miRNA, prekürsör miRNA

pri-miRNA: Birincil miRNA, primer miRNA

PTEN: Phosphatase And Tensin Homolog

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RAN: RAS ile ilişkili nükleer protein

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

RIBA: Rekombinant immünblot analiz

RISC: RNA kaynaklı susturma kompleksi

RLU: Relative light units

RNA: Ribonükleik asit

RNS: Reaktif nitrojen türleri

ROC: Receiver Operating Characteristic

ROS: Reaktif oksijen türleri

rpm: Dakikadaki devir sayısı

RT-PZR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

S/CO: Sample/Cut off

siRNA: Küçük susturucu RNAlar

sncRNA: Küçük kodlanmayan RNA

snoRNA: Küçük nükleolar RNA

SS: Standart sapma

ST: Stem Loop

SR-BI: Scavenger receptor type B class I

TGF-beta: Transforming growth factor beta

TMA: Transcription-Mediated Amplification

UTR: Untranslated region

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA NO

Şekil 1. HCV genomu ve kodladığı proteinler	5
Şekil 2. HCV genotiplerinin coğrafik dağılımı.....	12
Şekil 3. miRNA biyogenezi	24
Şekil 4. HCV genotiplerinin dağılımı	36
Şekil 5. Hasta ve kontrol gruplarının miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması ...	40
Şekil 6. miRNA ekspresyon seviyelerinin ROC analiz eğrileri.....	45
Şekil 7. Genotip gruplarının miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	46

TABLO DİZİNİ

SAYFA NO

Tablo 1. HCV'nin kodladığı proteinler ve işlevleri	7
Tablo 2. HCV genotipleri ve onaylanmış 73 alt tipi	11
Tablo 3. HCV RNA testi kit içeriği.....	29
Tablo 4. HCV RNA tayini kit içeriği	31
Tablo 5. cDNA sentez karışımı	32
Tablo 6. cDNA sentezinde kullanılan ST primer dizileri.....	33
Tablo 7. RT-PZR bileşimi	33
Tablo 8. RT-PZR'de kullanılan primer dizileri	34
Tablo 9. RT-PZR protokolü	34
Tablo 10. Genotip gruplarına göre cinsiyet verilerinin karşılaştırılması.....	37
Tablo 11. Genotip gruplarına göre yaş ve laboratuvar verilerinin karşılaştırılması..	37
Tablo 12. Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet yüzdeleri	38
Tablo 13. Kontrol ve hasta gruplarının laboratuvar sonuçları.....	39
Tablo 14. Kontrol ve hasta grupları miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	41
Tablo 15. Hasta grubu miRNA ekspresyonları ile diğer bulgular arasındaki ilişki ..	41
Tablo 16. Tek değişkenli lojistik regresyon analizi	43
Tablo 17. Çok değişkenli lojistik regresyon analizi	43
Tablo 18. ROC analizi.....	44
Tablo 19. Genotip gruplarına göre miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	47

ÖZET

HCV ile Enfekte Hastalarda Genotip Tayini Yapılması ve miRNA Düzeylerinin Araştırılması

Saniye KÜÇÜKAKIN YAKA

Hepatit C virüs (HCV) yüksek genetik varyasyonu sebebiyle aşıyla korunmanın mümkün olmaması, yüksek kronikleşme oranı, siroz, hepatoselüler karsinom(HSK) gibi komplikasyonları sebebiyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. Etken genotipin belirlenmesi hem prognozun öngörülmesi hem de tedavinin seçilmesi açısından önem taşımaktadır.

Kodlanmayan ribonükleik asit (RNA)'lerin bir çeşidi olan mikroRNA'lar (miRNA) protein sentezinin posttranskripsiyonel düzenlenmesinde rol alırlar. miRNA'ların kanda stabil kaldığının görülmesi ile hastalıkların tanısında kullanılabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmanın amacı; HCV ile enfekte hastalar arasındaki genotiplerin belirlenmesi ve genotipler arasında laboratuvar bulgularının karşılaştırılması; sağlıklı kişiler ile HCV enfekte hastaların plazma miRNA düzeylerinin karşılaştırılması, ve farklı genotipler arası miRNA düzeylerinin karşılaştırılarak aralarındaki ilişkinin incelenmesidir.

Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına gelen HCV RNA pozitif çıkan 50 hasta; hasta grubu olarak, 50 gönüllü kontrol grubu olarak seçildi. HCV RNA ve HCV genotip tayini gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu (RT-PZR) cihazında çalışıldı. miRNA-122, miRNA-155, miRNA-224, miRNA-21 genlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için hasta ve kontrol grubundaki katılımcıların plazmasından RT-PZR yapıldı. Gen ifadeleri, U6 referans geninin (housekeeping gen) varlığında, $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak analiz edildi.

HCV RNA pozitif çıkan 50 hastanın 13'ü (%26) genotip 1a, 14'ü (%28) genotip 1b, 1'i (%2) genotip 2, 22'si (%44) genotip 3 olduğu tespit edildi. Genotip 1a ile enfekte olan hastaların 2'sinin (%15,4) kadın, 11'inin (%84,6) erkek; genotip 1b ile enfekte hastaların 10'unun (%71,4) kadın, 4'ününün (%28,6) erkek; genotip 3 ile enfekte hastaların 4'ününün (%18,2) kadın, 18'inin (%81,8) erkek olduğu tespit edildi (p=0,001).

Genotip 1a ve 3 ile enfekte olan hastalarda erkeklerin anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü.

Genotip 1b ile enfekte hastaların genotip 1a ve 3 ile enfekte hastalardan anlamlı şekilde daha ileri yaşta olduğu görüldü ($p=0,004$). Her 3 genotip arasında AST, ALT, ALP ve HCV RNA değerleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

Kontrol grubunun 28'i (%56) kadın, 22'si (%44) erkek, hastaların ise 16'sı (%32) kadın, 34'ü (%68) erkekti ($p=0,016$). Hasta grubunda erkek sayısının anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü. Kontrol grubunun yaş ortalaması $36,42 \pm 9,22$ iken hasta grubunun yaş ortalaması $32,18 \pm 11,71$ olarak bulundu. Bu bulgulara göre hasta grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha gençti ($p=0,005$).

miRNA-122 ve miRNA-224 ekspresyonları açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunamazken, miRNA-155 ($p=0,014$), miRNA-21 ($p<0,0001$) ekspresyonlarının hasta grubunda anlamlı şekilde azaldığı görüldü. Aynı zamanda dört miRNA'nın ekspresyon seviyesi ile yaş, ALT, AST, ALP, HCV RNA seviyeleri arasında anlamlı ilişki olmadığı görülürken; dört miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin birbirleri arasında pozitif yönlü ilişkili olduğu bulundu.

ROC analizinde miRNA-155 ($p=0,014$) ve miRNA-21'in ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde hasta ve sağlıklı kişiler üzerinde ayırt edici olduğu görüldü. miRNA-155 %64,3 oranında hasta ve sağlıklı kişileri ayırt edebiliyorken; miRNA-21 %95,1 oranında hasta ve enfekte kişileri ayırt etti. Bu sonuçlar bize miRNA 21 ve miRNA155'in HCV enfeksiyonu tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürdü.

Her üç genotip arasında miRNA-122, miRNA-155, miRNA-224 ve miRNA-21 ekspresyon seviyeleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

Gelecekte miRNAların biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için standartizasyona ihtiyaç duyduğundan daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamız ülkemizdeki HCV genotip dağılımının bulaş yolunun değişimi ve göç gibi sebeplerle değişmiş olabileceğini göstermiştir. Bu konuda ve HCV insidansının azaltılması için çalışmalar yapılması gerektiği ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: HCV, HCV genotip, miRNA, mikroRNA

SUMMARY

Genotyping and Investigation of miRNA Levels in HCV Infected Patients

Saniye KÜÇÜKAKIN YAKA

Hepatitis C virus (HCV) is a significant public health issue due to its high genetic variability, which makes vaccination impossible, its high rate of chronicity, and complications such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Determining the genotype of the causative agent is important for predicting the prognosis and selecting the appropriate treatment.

MicroRNAs (miRNAs), a type of non-coding ribonucleic acid (RNA), play a role in the post-transcriptional regulation of protein synthesis. The observation that miRNAs remain stable in the blood has led to the idea that they could be used in the diagnosis of diseases.

The aim of this study is to identify the genotypes among patients infected with HCV and compare laboratory finding between the genotypes; compare the plasma miRNA levels of healthy individuals with those of HCV infected patients; and investigate the relationship between miRNA levels by comparing them across different genotypes.

Fifty HCV RNA-positive patients who visited the Central Laboratory of Pamukkale University Hospital were selected as the patient group, and 50 voluntary individuals were selected as the control group. HCV RNA and HCV genotype determination were performed using a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) device. RT-PCR was conducted on the plasma of participants from both the patient and control groups to determine the expression levels of miRNA-122, miRNA-155, miRNA-224, and miRNA-21 genes. Gene expression was analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method in the presence of the U6 reference gene (housekeeping gene).

Among the 50 patients who tested positive for HCV RNA, 13 (26%) were infected with genotype 1a, 14 (28%) with genotype 1b, 1 (2%) with genotype 2, and 22 (44%) with genotype 3. Among the patients infected with genotype 1a, 2 (15.4%) were women and 11 (84.6%) were men; among those infected with genotype 1b, 10 (71.4%)

were women and 4 (28.6%) were men; and among those infected with genotype 3, 4 (18.2%) were women and 18 (81.8%) were men ($p=0.001$). It was observed that there were significantly more men among the patients infected with genotypes 1a and 3.

It was found that patients infected with genotype 1b were significantly older than those infected with genotypes 1a and 3 ($p=0.004$). No significant difference was observed between the three genotypes in terms of AST, ALT, ALP, and HCV RNA levels.

In the control group, 28 (56%) were women and 22 (44%) were men, while in the patient group, 16 (32%) were women and 34 (68%) were men ($p=0.016$). It was observed that the number of males in the patient group was significantly higher. The average age of the control group was 36.42 ± 9.22 , while the average age of the patient group was 32.18 ± 11.71 . According to these findings, the patient group was significantly younger than the control group ($p=0.005$).

No significant difference was found between the two groups in terms of miRNA-122 and miRNA-224 expression. However, the expression of miRNA-155 ($p=0.014$) and miRNA-21 ($p<0.0001$) was significantly reduced in the patient group. Furthermore, there was no significant relationship between the expression levels of the four miRNAs and age, ALT, AST, ALP, or HCV RNA levels. It was also found that the expression levels of the four miRNAs were positively correlated with each other.

In the ROC analysis, miRNA-155 ($p=0.014$) and miRNA-21 ($p<0.001$) were found to be statistically significant in distinguishing between patients and healthy individuals. miRNA-155 could differentiate between patients and healthy individuals with an accuracy of 64.3%, while miRNA-21 could distinguish between patients and healthy individuals with an accuracy of 95.1%. These results suggest that miRNA-21 and miRNA-155 could be used as biomarkers in the diagnosis of HCV infection.

No significant difference was found between the three genotypes in terms of the expression levels of miRNA-122, miRNA-155, miRNA-224, and miRNA-21.

In the future, further studies are needed as miRNAs require standardization before they can be used as biomarkers. Our study suggests that the distribution of HCV genotypes in our country may have changed due to factors such as changes in transmission routes

and migration. It highlights the need for further research in this area and efforts to reduce the incidence of HCV.

Key words: HCV, HCV genotype, miRNA, microRNA

GİRİŞ

HCV; akut hepatit, kronik hepatit, siroz, hepatosellüler kansere neden olabilen, Hepatit A ve Hepatit B'den farklı transfüzyon kaynaklı bir viral hepatit olarak 1975 yılında tanımlanmıştır. Non-A non-B hepatit vakalarının yaklaşık %90'ının etkeni olarak gösterilmiştir (1). Dünyada tahmini olarak 50 milyon kişi HCV ile enfektedir ve bu hastaların %85'inde virüs klirensi sağlanamayarak kronik enfeksiyon gelişmektedir (2).

HCV yüksek derecede genetik çeşitliliğe sahiptir. Yapılan filogenetik ve sekans analizleri ile 8 genotipe ayrılmış bunun yanında 100'e yakın subtip tanımlanmıştır. Bu subtiplerden 73 tanesi onaylanmıştır (3). Gower ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan bir metaanalizde %46 oran ile genotip 1'in tüm dünyada en yaygın genotip olduğu bulunmuş ve bunu genotip 3 (%22), genotip 2 (%13) ve genotip 4 (%13) takip etmektedir. Bunlar içinde tek başına subtip 1b'nin en yaygın subtip olduğu ve tüm enfeksiyonların %22'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (4). Türkiye'de yapılan bir çalışmada HCV genotipleri içinde genotip 1b %66.7-100 arasında olup birinci sıklıkla görülmektedir (5).

HCV enfeksiyonundan şüphelenildiğinde ilk yapılan test enzim immün analiz (EIA) prensibiyle çalışan anti-HCV testleridir. Ancak bu testler geçirilmiş bir enfeksiyon mu yoksa devam eden bir enfeksiyon mu olduğunu göstermez (6). Kandaki HCV RNA testi enfeksiyondan 1-2 hafta sonra, anti-HCV antikorları yükselmeden ve karaciğer enzimleri değişmeden tespit edilebilir seviyelere yükselir (7). Genotip tayini için ise en kesin sonucu veren yöntem genom C (nükleokapsid proteini, kor protein, core protein), E1 (envelope 1, zarf) ya da NS5B (yapısal olmayan, nonstructural) bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile çoğaltılarak dizi analizinin yapılmasıdır (8). Ancak dizi analiz yöntemleri gelişmiş laboratuvarlarda uygulanabilirler. Bu nedenle genotip tayininde daha basit yöntemler uygulanmaktadır; bunlardan biri de kor ya da NS5 bölgeleri hedef alınarak yapılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile genotiplendirme (9).

HCV ile enfekte hastanın tedaviye yanıtını belirleyen en önemli faktörler, etken virüsün genotipi ve tedavi başlangıcındaki viral yüküdür (10). Standart tedavilerin, viral klirensin sağlanmasında yetersiz kalmasının yanında yüksek maliyeti ve yan

etkileri nedeniyle günümüzde doğrudan etkili antiviral tedavileri önem kazanmaktadır. Doğrudan etkili antiviral tedavilerin öneminin artmasıyla etken virüsün genotip ve alt tipinin önemi daha da önemli hale gelmiştir. Bu artan önem nedeniyle tanı, tedavive tedavi takibi için yeni biyomarkerlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kodlanmayan RNA'ların bir çeşidi olan miRNA'lar 18 ila 28 nükleotid uzunluğunda olup protein ekspresyonlarının post transkripsiyonel düzenlenmesinde rol alırlar. Bu küçük moleküller hücre farklılaşması, hücre döngüsü ve apoptoz gibi önemli hücresel süreçler üzerinde etkili oldukları gösterilmiştir (11). miRNA'lar hedef mesajcı RNA (mRNA)'ların 3'NCR (NCR: non-coding region ya da UTR: untranslated region) bölgesine bağlanarak ekspresyonu baskılamak; 5'NCR bölgesine de bağlanarak ekspresyonu baskıladığı veya aktive ettiği gösterilmiştir (12).

Mitchell ve ark. yaptıkları bir çalışmada dolaşımdaki miRNAların RNaz enzimleri tarafından yıkılmadıklarını bu nedenle miRNA düzeyinin kanda stabil kaldığını göstermişlerdir. Bu sayede miRNA'ların hastalıkların teşhisinde belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (13). miRNA'lar hepatik gelişimin hemen her aşamasında aşağı ve yukarı regüle olarak karaciğer proliferasyonunu hızlandırır veya inhibe ederler. Çeşitli karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Karaciğerde 277 miRNA'nın eksprese edildiği, miRNA-122'nin en bol bulunan ve karaciğere spesifik miRNA'lardan biri olduğu gösterilmiştir (14).

Yapılan çalışmalarda çeşitli miRNA'ların HCV enfeksiyonun farklı evrelerinde kandaki ve dokudaki miktarlarının değiştiği gösterilmiştir. Belirlenen miRNA'lar üzerinde yapılacak ileri çalışmalarla tanı, karaciğer hastalığının evresi konularında daha ayrıntılı bilgi verebileceğini, teröpatik ajan olarak kullanılacaklarını ortaya koymuştur (14, 15). Bunun yanında miRNAların HCV'nin farklı subtipleri ile enfeksiyonunda kan düzeylerinin değişiminde fark olup olmadığı ile ilgili yeterli çalışma olmadığı görülmüştür.

Bu çalışmada; HCV ile enfekte hastaların örneklerinden genotip tayininin yapılması; sağlıklı kişiler ile HCV enfekte hastaların plazma miRNA düzeylerinin karşılaştırılması, farklı genotipler arası miRNA düzey değişimlerinin karşılaştırılması, HCV enfekte hastalardaki HCV RNA viral yük, AST (aspartat aminotransferaz), ALT

(alanin aminotransferaz), ALP (alkalen fosfataz) değerlerinin miRNA düzeyleriyle karşılaştırılması yapılarak tedavi protokollerinin belirlenmesine yardımcı olmak ve miRNA düzeylerinin biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı hakkında bilgi sahibi olmak amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Hepatit C Virüs

Tarihçe

1970'li yıllarda Hepatit A ve B virüslerinin (HAV, HBV) kolaylıkla tespit edilmelerinden sonra, bu iki virüs dışında özellikle transfüzyonla bulaşabilen başka hepatitlerin de olabileceği düşünülmüş ve bu olgulara non-A non-B hepatit adı verilmiştir. Non-A non-B hepatit olarak isimlendirilmeden sonra bu hepatit türüne Prince ve ark. HCV adını vermişlerdir (16).

HCV adı verilen bu etkenin genomu ise 1989 yılında Choo ve ark. tarafından hepatitli insan kanı ile enfekte edilmiş faktör VIII ile enfekte edilen şempanzelerin karaciğer ve kanından klonlanmıştır (17).

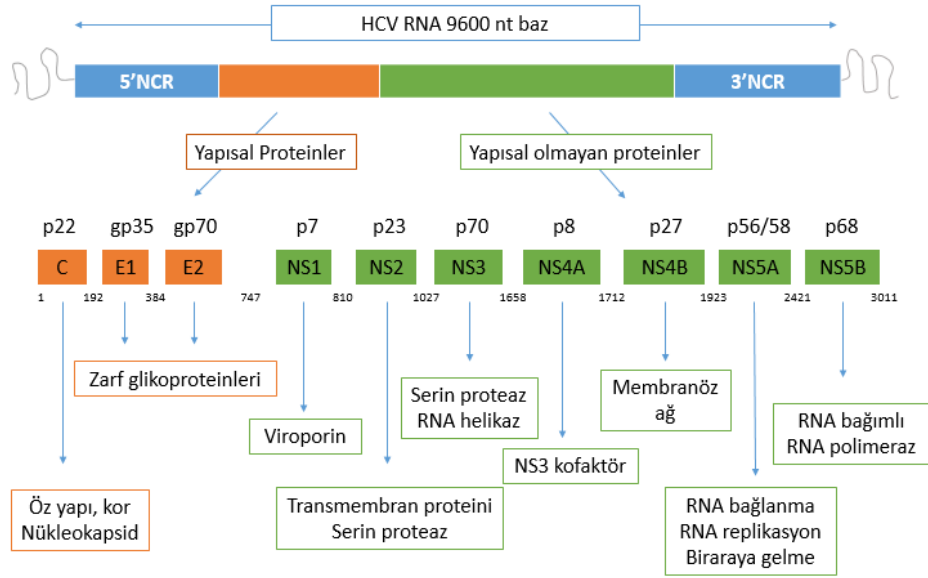
HCV *Flaviviridae* ailesinde, *Hepacivirüs* cinsi içinde yer almaktadır. *Flaviviridae*; *pestitivirüs*, *hepacivirüs* ve *flavivirüs* cinslerini içeren bir ailedir (18).

HCV Yapısı ve Genomu

HCV, 40-80 nm çapında, zarflı, pozitif polariteli, tek iplikli bir RNA virüsüdür. Genomik RNA'yı kaplayan nükleokapsid ikozahedral simetridir ve kor proteinini içermektedir. E1 ve E2 zarf glikoproteinlerinin gömülü olduğu konak hücre kaynaklı çift katmanlı lipid zarf nükleokapsidi çevrelemektedir. Virüsün ana bileşenleri E1, E2 ve C proteinleridir (19, 20).

HCV RNA genomu 9600 nükleotid uzunluğunda olup 5' ve 3' uçlarında translasyona uğramayan yani herhangi bir proteini kodlamayan (NCR ya da UTR) ancak viral proteinlerin translasyonunda ve virüsün replikasyonunda görev alan bölgeler vardır. 5'-NCR içinde IRES (internal ribosomal entry site) adı verilen bölge bulunur. Bu bölge viral genomun ribozomun 40S alt ünitesine tutunduktan sonra başka bir translasyon başlatıcı sinyale gerek duymaksızın ribozom tarafından okunmasını

sağlar (21). 5'-NCR yaklaşık 340 nükleotid uzunluğundadır. 3'-NCR ise 200 ile 235 nükleotid arasında değişmekte olup RNA replikasyonu için kritik öneme sahip, değişken bir poly (U/UC) bölgesi ve iyi korunmuş değişmez x kuyruk bölgesi içerir. 5' ve 3' uçlarında translasyona uğramayan bölgeler arasında iyi korunmuş yaklaşık 3000 aminoasitlik bir polipeptidi kodlayan açık okunur bölge (ORF) bulunur (22). Bu ORF bölgesinden kodlanan viral polipeptitler virüse ve konağa ait proteazlar tarafından işlenir. İşlendikten sonra yapısal ve yapısal olmayan 10 adet viral protein oluşur (21). Bunlardan yapısal olan 3 protein; nükleokapsid proteini (kor protein, core protein, C) ve iki zarf proteinidir (E1,E2). Yapısal olmayan proteinler ise virüsün oluşumunda rolleri kesin olmayan iki protein (p7 (NS1) ve NS2) ile viral replikaz kompleksini oluşturan beş proteinden (NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B) oluşmaktadır (Şekil 1) (23).



Şekil 1. HCV genomu ve kodladığı proteinler (18)

Yapısal Proteinler

C proteini, E1 ve E2'den oluşmaktadır. C proteini sinyal peptidaz ile polipeptidin amino terminal ucundaki 191 aminoasitlik bölgenin ayrılmasıyla oluşur. C proteini immünojeniktir ve virüsle infekte hastaların kanında hem kendisi hem de proteine karşı gelişen antikorlar saptanabilmektedir. C proteininin doğal öldürücü

(natürel killer (NK)) hücre yanıtı ve T hücre çoğalmasını inhibe ederek HCV'nin immün sistemden kaçmasında rol aldığı gösterilmiştir (24).

Transmembran glikoproteinleri olan E1 ve E2, viral poliproteinin sırayla 383 ve 746. sıradaki aminoasitlerden kesilerek oluşturulur. "Cluster of differentiation" 81 (CD81), "scavenger receptor BI" (SR-BI) ve occludin, claudin gibi konak hücre reseptörlerine bağlanmada E2'nin reseptör görevi gördüğü, E1'in ise virüsün füzyonla konak hücre içine girişte rol oynadığı düşünülmektedir (25).

E2, çok değişken bölge (hypervariable region; HVR) olarak adlandırılan ve HCV'nin en çok değişkenlik gösteren bölgeleri olan bölümleri içermektedir. Bu bölgeler HVR-1, HVR-2 ve HVR-3 olmak üzere üç parçadır. Bu üç parça içinde ise HVR-1 en çok değişkenlik gösteren bölgedir. İşlevi çok fazla aydınlatılmış olmasa da HVR-1'in immün sistem hücrelerinin reseptör olarak tanıdığı zarf içindeki bir yapıyı kapattığı ve böylece HCV'nin immün sistemden kaçabildiği öne sürülmektedir (24).

Yapısal Olmayan Proteinler

Virüsün yapısal olmayan proteinleri p7 (NS1), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B'dir ve viral poliproteinin virüsün proteazıyla kesilmesiyle oluşmaktadır. P7 proteini iyon kanalı özelliğinde olup virüsün bir araya gelme sürecinde rolü olduğu düşünülmektedir (25).

NS2 proteini hidrofobik bir transmembran proteindir ve sistein proteaz aktivitesi sayesinde NS2/NS3 kesilmesinde görev alır. NS3 proteini nükleozid trifosfaz (NTPaz), serin proteaz ve RNA helikaz aktivitesine sahiptir. Bu protein ise NS3/4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A ve NS5A/NS5B bölünmesinden sorumludur (25).

NS4A proteini, NS3 için bir kofaktördür. NS4B proteini, viral replikasyonun gerçekleştiği bölge olan endoplazmik retikulum üzerindeki membranöz ağ oluşumuna katılır (25).

NS5A proteini, RNA replikasyonunda rol oynadığı bilinen, üç bölgeden (Domain: D1, D2, D3) oluşan membrana bağlı bir fosfoproteindir. D1, D2 bölgeleri RNA bağlanması ve dimerizasyonunda görev alırken D3 bölgesi lipid damlacıkları üzerinden kor proteini ile etkileşime girerek viral tutunmada görev almaktadır (24).

Ayrıca NS5A proteinin 40 aminoasitlik kısmı interferon duyarlılığını belirleyen bölge (ISDR, interferon sensitivity determining region) olarak isimlendirilmiştir. ISDR ile ilgili mutasyonlar interferon (IFN) direncinden sorumludur (26, 27). NS5B proteini RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesine sahiptir. Bu aktivitesiyle HCV'nin pozitif iplikçikli RNA'sından tamamlayıcı negatif iplikçikli RNA'nın sentezinde, daha sonra ise bu negatif iplikçikli RNA'dan pozitif iplikçikli RNA sentezinde görev alır (Tablo 1) (20).

Tablo 1. HCV'nin kodladığı proteinler ve işlevleri

Aminoasit	Protein	İşlevi
1-191	C	Nükleokapsid
192-383	E1	Zarf glikoprotein
384-746	E2	Zarf glikoprotein
747-809	P7	İyon kanal özelliği
810-1026	NS2	Sistein proteaz
1027-1657	NS3	Serin proteaz, RNA helikaz, NTPaz
1658-1711	NS4A	NS3'ün aktivitesi için kofaktör
1712-1922	NS4B	Membranöz ağ oluşumu
1923-2420	NS5A	ISDR (interferon direnci)
2421-3010	NS5B	RNA bağımlı RNA polimeraz

HCV Replikasyonu

Tutunma ve Hücreye Giriş

HCV vasküler endoteli geçer ve sonra hepatositin bazolateral yüzeyleri ile temas eder. Glikozaminoglikanlar (GAGs), C-lectinler ve düşük dansiteli lipoprotein reseptör (LDL-R) aracılığıyla hücre yüzeyinde yoğunlaşır daha sonra viral reseptörler ile hücreye tutunarak hücreye girişi gerçekleşir (28).

HCV viral resöpler ile konak hücredeki SR-BI, CD81, occludin ve claudine bağlandığı, hücreden hücreye bu reseptörler aracılığıyla geçebildiği düşünülmektedir. Bu reseptörlere bağlanma HCV'nin kltrin güdümlü endositoz ile hücre içine alınmasıyla sonuçlanır. Endozom asidifikasyonu füzyon peptidleri açığa çıkarır ve bu

peptidler yardımıyla viral ve endozomal zarlar birleşir, kapsid soyulur, genom sitozole salınır (29).

Translasyon

Viral genomun 5' ucundaki IRES bölgesi ribozomun 40S alt birimine bağlanır ve sonra viral poliprotein sentezi başlar. Daha sonra viral poliprotein viral ya da konak hücreye ait proteazlar tarafından işlenerek viral proteinler ortaya çıkar (25).

Replikasyon

NS4 proteininin oluşturduğu membranöz ağ içerisinde yapısal ve yapısal olmayan proteinler birikir ve yapısal olmayan proteinler replikasyon kompleksini oluşturmaktadır. RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesine sahip olan NS5B pozitif iplikçikli RNA molekülünü kalıp olarak kullanarak yeni viral genomları ortaya çıkarmaktadır (25).

Bir Araya Gelme ve Salınma

Viral genom sentezlendikten sonra kapsid proteinleri sentezlenir. Viral genomun sentezlenen kapsid proteinleriyle sarılması sonucu nükleokapsid yapısı oluşur. Nükleokapsid yapısı oluşuktan sonra virüs endoplazmik retikulumdan tomurcuklanarak zarf yapısını kazanır. Zarf yapısını kazanan virüs golgi cisimciğine transport olur ve ekzositoz yoluyla hücre dışına salınır (25).

İmmunopatoloji

HCV ve enfekte ettiği hücelere karşı oluşan humoral ve hücreyel immün yanıt mekanizması poliklonal ve multispesifiktir. İmmun yanıtta görev alan hücreler virüsün baskılanmasında etkili olduğu gibi, karaciğer hasarının oluşumuna da neden olurlar (30). HCV E2 proteini ile konak hücre CD81'ine bağlanarak hücre içine girer. CD81; hepatositler, B-lenfositler, T-lenfositler ve NK gibi çeşitli hücre tiplerinde farklı işlevleri olan bir hücre yüzey proteinidir (31). Virüse karşı aktive olan ilk hücreler NK hücreleridir. Enfeksiyonun olduğu bölgede hızla toplanan NK hücreleri hem enfekte hücreleri ortadan kaldırarak hem de sitokin ve kemokin üreterek hastalık patogenezini doğrudan etkiler (32). Dentritik ve diğer antijen sunan hücreler ile

etkileşen diğer viral proteinler sitotoksik T lenfosit (CTL) yanıtını başlatır (33). Klonal olarak çoğalmış aktive CTL'ler lenf bezlerinden enfekte dokulara yönelirler. CTL'ler Fas ve perforin yolağının aktive olması ile sitopatik etki gösterirler. Bu sitopatik etki karaciğer hasarının başlıca nedenidir (34).

HCV diğer hepatit virüsleri gibi sitopatik değildir. Enfekte hücreler immun yanıtı başlatır ve bu immun yanıt hepatosit hasarına sebep olur. Hastalığın kronikleşmesi T hücre cevabı ile ilişkilidir. Güçlü hücrel immun yanıt iyileşmeyi sağlar. İyileşen hastalarda periferik kanda saptanabilir ölçüde CD4+ T hücre cevabı gösterilirken, CD8+ T hücre cevabı gösterilememiştir. Kronikleşmiş enfeksiyonu hastaların periferik kanında CD8+ T hücre cevabı varken, CD4+ T hücre cevabı yoktur (35).

HCV'de karaciğer hasarı bağışıklık sisteminin yanında virüsün direkt olarak reaktif oksijen türlerini (ROS) ve reaktif nitrojen türlerini (RNS) arttırması ile hücre içi anti-oksidan kapasitelerinde azalmasına neden olur. Bu durum hem profibrojenik sitokin olan TGF-beta'yı (Transforming growth factor beta) arttırırken hem de hücrel deoksiribonükleik asitte (DNA)'da hasar oluşturarak HSK gelişimine yol açar (36).

Ayrıca bazı hastalarda siroz olmadan HSK gelişebilmesi virüsün onkojenik özellikler taşıdığını düşündürmektedir. Kor proteininin protoonkogenleri aktive ederek, apoptozu inhibe ederek ve tümör reseptör genine (p53) etkisiyle onkojenik etki yaptığı bilinmektedir. Kor proteini NS5B proteinleri ile beraber tümör supresör gen olan retinoblastom proteinini inhibe eder (36, 37).

Epidemiyoloji

Dünya nüfusunun yaklaşık %1'i yani tahmini olarak 50 milyon kişi HCV ile enfektedir ve bu hastaların %85'inde virüs klirensi sağlanamayarak kronik enfeksiyon gelişmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2024 raporuna göre 2022 yılında HCV ile enfekte yeni kişi sayısı 1 milyon olarak bildirilmiştir (2). HCV gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinom gibi karaciğer hastalıklarının en önemli nedeni olarak gösterilmektedir (38). Dünya Sağlık Örgütü'ne

göre 2022 yılında 240.000 kişi HCV'ye bağlı karaciğer hastalığı nedeniyle ölmüştür (2).

HCV prevalansı HBV prevalansından daha düşük olmasına rağmen daha heterojen dağılıma sahiptir. HCV enfeksiyona sahip kişiler damar içi madde kullanıcıları, homoseksüeller ve güvenli sağlık hizmetlerinin yaygın olmadığı bölgelerde yaşayanlardır. Geçmişte sağlık uygulamalarında sterilizasyona uyulmadığı ve tek kullanımlık malzemelerin yaygınlaşmadığı dönemlerde enfekte olan olgular “kohort etkisi” fenomenini oluşturmakta; virüs ile enfekte ve bulaş riski oluşturan yaşlı bir nüfusu oluşturmaktadır (2).

HCV prevalansı bölgenin gelişmişlik düzeyi, bölgesel risk faktörleri, virüsün genomik farklılıklarından dolayı her coğrafyada farklıdır. Doğu Akdeniz ülkeleri (%1,8) ve Avrupa (%0,9) yüksek prevalans oranına sahip bölgelerdir (2). Asya ve Afrika gibi az gelişmiş ülkelerde prevalans yüksek orandayken, Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve Avusturalya gibi sanayileşmiş ülkelerde prevalans düşüktür (39).

En yüksek prevalans Mısır'da, en düşük prevalans ise İngiltere ve İskandinav ülkelerinde bulunmuştur. Prevalansın en yüksek olduğu Mısır'da, prevalans yaşla birlikte artar, fakat tüm yaş gruplarında yüksektir (40). Türkiye, İspanya, İtalya, Japonya ve Çin gibi ülkelerde de yaş ilerledikçe prevalans artmaktadır. Bu da bize bu ülkelerde 40-60 yıl önce HCV enfeksiyon riskinin yüksek olduğunu göstermektedir (41).

Ülkemizde yapılan çalışmalara göre HCV prevalansının %0,3-1,8 olduğu tahmin edilmektedir (42, 43). Ülkemizde yapılan bir çalışmada anti-HCV sıklığı %1 olarak bulunmuş ve prevalansın 50 yaşından sonra arttığı gözlenmiştir (42). Sağlık Bakanlığı'nın 2016 verilerine göre anti-HCV pozitifliği hemodiyaliz hastalarında %3,8, diyaliz hastalarında %1,7, böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda %1,96, karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda ise %7,6 olarak bulunmuştur (44). Sağlık Bakanlığının 2018 yılında yayınladığı Türkiye Viral Hepatit Önleme ve Kontrol Programı'nda 18 yaş üstü nüfusta yaklaşık 250.000-550.000 kişinin virüs ile enfekte olduğu ve bu hastaların çoğunun bu durumun farkında olmadığı bildirilmiştir (44).

Genotip

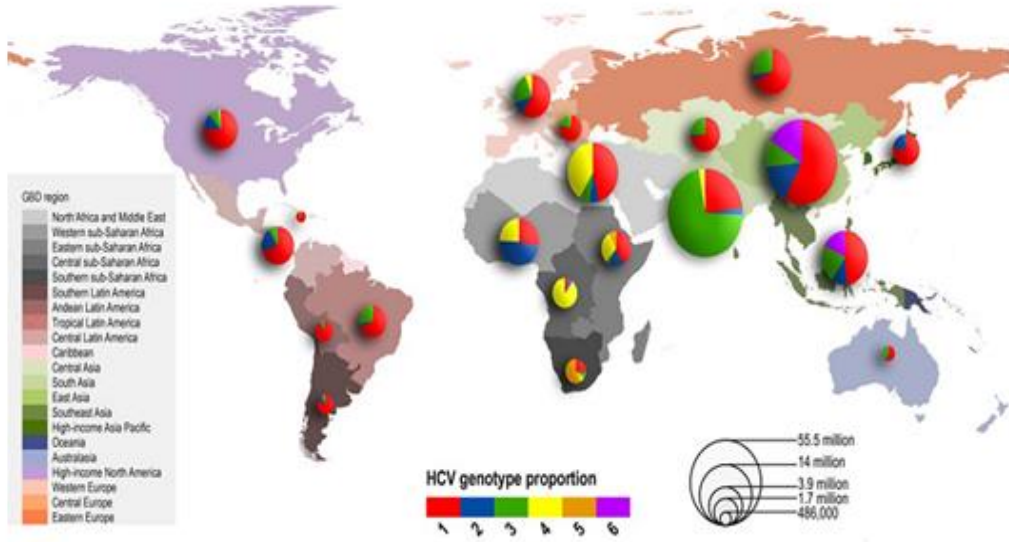
1989 yılında Choo ve arkadaşları HCV'yi klonlayıp genomunu belirledikten sonra dünyanın birçok bölgesinde HCV genomu sıralanmış ve değişik HCV tipleri elde edilmiştir (17, 45). Genom dizileri belirlenmiş HCV'ler karşılaştırıldığında; virüsün tüm bölgelerini kapsayan benzerlikler fark edilmiş ve bunlar grup ve subgroup olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma genotiplerin ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır. Genotipler rakamlar ile (1, 2, ...), alt tipler ise küçük harfler ile (a, b, c, ...) gösterilmektedir (46). Genom dizilerinde %65-70 benzerlik olanlar genotip olarak tanımlanmaktadır. Yani aynı genotipe ait HCV suşları %30-35'in altında aynı alt tipe ait HCV suşları ise %15'in altında genom farklılığı gösterir. HCV 8 genotipe ve bu genotipler içinde yaklaşık 100 alt tipe ayrılmıştır. Bu alttiplerden 73 tanesi onaylanmıştır (Tablo 2) (3, 46).

Tablo 2. HCV genotipleri ve onaylanmış 73 alt tipi

Genotip	Alt Tip
1	a, b, c, d, e, g, h, i, j, k, l, m, n, o
2	a, b, c, d, e, f, i, j, k, l, m, q, r, t, u, v
3	a, b, d, e, g, h, i, k
4	a, b, c, d, f, g, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, v, w
5	a
6	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u, v, w, xa, xb, xc, xd, xe, xf, xg, xh, xi, xj
7	a, b
8	a

Epidemiyolojik çalışmalara göre HCV genotipleri ve alt tiplerinin yaygınlığı coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Tüm dünyada en yaygın görülen genotipler 1, 2 ve 3 iken genotip 4, 5 ve 6'nın görüldüğü coğrafik bölgeler sınırlıdır (46). Gower ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan bir metaanalizde %46 oran ile genotip 1'in tüm dünyada en yaygın genotip olduğu bulunmuş ve bunu genotip 3 (%22), genotip 2 (%13) ve genotip 4 (%13) takip etmiştir. Bunlar içinde tek başına subtip 1b'nin en yaygın subtip olduğu ve tüm enfeksiyonların %22'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (4).

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa’da genotip 1, Sahra altı Afrika, Mısır ve Ortadoğu’da genotip 4, Güney Afrika’da genotip 5, Hindistan ve Pakistanda genotip 3 en yaygın olarak görülmektedir (Şekil 2) (47).



Şekil 2. HCV genotiplerinin coğrafik dağılımı (48)

Türkiye’de yapılan çalışmalarda HCV genotipleri içinde genotip 1b %66,7-100 arasında olup birinci sıklıkla görülmektedir. İkinci sıklıkla gösterilen genotip ise %5,8-33,3 oranındaki genotip 1a’dır. Daha az sıklıkla genotip 2a, 3a, 4, 4c bildirilmiştir. Görüldüğü gibi, Türkiye’de genotip 1 HCV’li olguların %81-96,7’sinde saptanmıştır (5).

Viral genotipin belirlenmesi enfeksiyon kaynağı, prognoz ve tedavi seçenekleri açısından önemlidir. HCV tedavisinde doğrudan etkili antivirallerin kullanılmasıyla genotip ve alt tip belirlenmesi daha da önem kazanmıştır. Genotip 1 enfeksiyonlarında kronik hepatit ve siroz gelişimi daha yüksek iken IFN tedavisine yanıt daha düşüktür. Genotip 3 ile enfekte olan hastalarda ise steatoz ve fibrozis gelişimi daha yüksektir (18). Damar içi uyuşturucu kullananlarda genotip 3 ve 2, kan transfüzyonu sonrası ve sporadik hepatitlerde ise genotip 1b’nin daha yaygın gözlenmiştir (49).

Türümsü (Quasispecies)

HCV ile enfekte hastanın dolaşımındaki virionların yarı ömrünün 45 dk olması hastada günde yaklaşık 10^{10} - 10^{12} virion partikül üretilmesine sebep olmaktadır. Bu viral döngünün sık olması ve virüsteki NS5B geni tarafından kodlanan RNA bağımlı RNA polimeraz enziminin doğrulama mekanizmasının ‘proofreading aktivitesinin’ olmaması yüksek mutasyon sıklığına yol açmaktadır. Bu mutasyonlar virüs genomunun 5’ NCR bölgesi hariç her bölgede olmakla birlikte en sık E2’de bulunan HVR1 bölgesinde olmaktadır. Bu nedenle HCV ile enfekte hastanın dolaşımında aynı genoma sahip homojen bir HCV popülasyonu bulunmaz ve genetik olarak farklı fakat birbirine oldukça yakın varyantlar meydana gelir. Bu varyant havuzuna türümsü (quasispecies) adı verilir (50, 51). Bu türümsüler virüse önemli derecede avantaj sağlamakta, virüsün yeni çevre koşullarına uyumunu kolaylaştırmakta ve antiviral tedavilerde dirence sebep olabilmektedir. HVR1 bölgesindeki mutasyonların IFN direncinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (52).

Bulaş Yolları

HCV bulaş yolları arasında damar içi madde kullanımı, kan transfüzyonları ve uygunsuz medikal işlemlerdir. Damar içi madde kullanımı gelişmiş ülkelerde en sık sebepken, kan transfüzyonları gelişmekte olan ülkelerde en sık bulaş sebebidir. HCV bulaşını başlıca parenteral, cinsel ilişki ile ve perinatal bulaş olarak sınıflayabiliriz (53).

1 Parenteral Bulaş

HCV bulaşının en sık sebebi parenteral bulaştır.

Kan ve Kan Ürünleri

Geçmişte yapılan kan transfüzyonu HCV bulaşı için büyük bir risk faktörüdür. HCV 1970-1980’li yıllarda transfüzyonla bulaşan en önemli viral etken olmuş ve bu yıllarda yapılan transfüzyonların yaklaşık %7-10’ununda virüsün bulaştığı bulunmuştur. 1990’da anti-HCV antikorları açısından verici taramanın başlamasıyla

bu bulaş riski çok düşmüştür (54). Ülkemizde ise anti-HCV taraması 1996 yılından itibaren başlamıştır (55).

Damar İçi Madde Kullanımı

Gelişmiş ülkelerde damar içi madde kullanımı HCV bulaşının başlıca yoludur. Dünya üzerinde yaklaşık 10 milyon damar içi madde kullanan kişinin anti-HCV pozitif olduğu tahmin edilmektedir. Damar içi madde kullanımına bağlı anti-HCV pozitifliği %60-80'lerde saptanabilmektedir. Bu hastalarda tedavinin amacı sadece HCV'ye bağlı morbidite ve mortalitenin azaltılması değil, ortak enjektör kullanımı sebebiyle bulaş riskini de engellemektedir (56).

Hemodiyaliz

Hemodiyaliz hastaları HCV gibi kan yoluyla bulaşan etkenlere karşı daha açıktır, bunun sebebi hemodiyalizin vasküler bir giriş gerektirmesi ve hemodiyaliz hastalarının bağışıklık sisteminin zayıf olmasıdır (57). Gelişmiş ülkelerde hemodiyaliz hastalarında HCV prevalansı %2,6 ile %22,9 arasında değişmekle birlikte, uzun süre hemodiyalize devam edenlerde, kan transfüzyonu olanlarda, erkeklerde, diyabet hastalarında, nakil öyküsü olanlarda ve alkol kullananlarda risk daha fazla artmaktadır (58).

Meslek ile İlgili Bulaşma

HCV ile enfekte hastalardan sağlık çalışanına bulaşın en önemli kaynağı kazara iğne iğne batmasıdır, düşük oranlarda konjonktivaya kan sıçraması ile de bulaş olabilmektedir. Sağlık çalışanları arasındaki HCV oranı normal popülasyonla yaklaşık aynıdır (59).

Doku Transplantasyonu

Anti-HCV pozitif vericiden yapılan doku transplantasyonu ile de bulaş olabilmektedir. Hastaların immümsüprese olması sebebiyle anti-HCV testleri değerli değildir ve HCV RNA testleri gereklidir (60).

Diğer

Dövme, insan ısırığı ve geleneksel halk tedavileri (akupunktur ve hacamat gibi) ile de HCV bulaşı olabilmektedir (61, 62).

2 Perinatal Bulaş

HCV RNA pozitif anneden bebeğe perinatal bulaş %5.8 iken insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile koenfeksiyon durumunda bulaş %10.8 olduğu bulunmuştur. Viral yükün fazla olması ve invaziv girişimler de riski arttıran diğer durumlardır (63). Perinatal bulaş genellikle intrauterin yolla veya intrapartum (doğum sırasında) olmaktadır, postpartum bulaşmalar ise çok nadirdir. HCV ile enfekte anneden bebeğe emzirme ile bulaş olduğuna dair bir kanıt ise henüz yoktur (64).

3 Cinsel Yolla Bulaş

Tükrük ve semende HCV RNA saptanmıştır, bu yüzden HCV cinsel temas ile de bulaşabilir. Tek bir partnerle heteroseksüel ilişki ile HCV bulaş riskinde normal popülasyona göre bir artışın olmadığı düşünülmektedir. Riski arttıran faktörler; cinsel partnerin yüksek risk grubunda olması (homoseksüel veya biseksüel olması, damar içi madde kullanması), partner sayısının fazla olması, cinsel yolla bulaşan başka hastalıklar (HIV ile koenfeksiyon) olmasıdır (65).

Klinik

Hastaların çoğu asemptomatik olduğu için akut dönemde tanı koymak oldukça zordur ve hastaların çoğunda kronik enfeksiyon gelişir. Hastaların sadece %25'inde hepatit ve buna bağlı sarılık görülür. Hepatit B enfeksiyonunun aksine akut dönemde tanı koymak önemlidir çünkü tedavi ile kronikleşme olasılığının azaltılabileceği gösterilmiş. Bu yüzden şüpheli bir temas olduğunda hasta serum ALT düzeyi haftalık izlemlerle takip edilmeli yükselme oluyorsa HCV RNA bakılması önerilmektedir. HCV ile karşılaşmadan sonraki birkaç gün ile üç hafta içinde HCV RNA kanda saptanabilmektedir fakat anti-HCV tespit edilebileceğimiz düzeye yükselmesi üç ayı bulabilir (23, 66).

Akut HCV enfeksiyonundan sonra; erkek olmak, ileri yaş, etnik köken (zenci olmak), HIV veya HBV ile koenfeksiyon olması, aşırı alkol kullanımı, hafif klinik ve immünsuprese olmak kronikleşmeyi arttıran faktörlerdir. Hastalar çok farklı klinik seyir göstermektedir. Siroza ilerleyen vakalar da çok farklı klinik seyir gösterir. O yüzden hastalar yakın takip edilmelidir. Hastalığın seyrini en iyi gösteren test karaciğer biyopsisidir. Tedavi öncesi yapılan karaciğer biyopsisi hem karaciğer hasarını iyi tanımlar hem de hastalık sürecinin nasıl ilerleyeceğini öngörmekte çok faydalıdır (23, 67).

İn vitro çalışmalar HCV C proteininin ve NS3 proteininin konak hücrelerini transforme edebildiğini göstermiştir, HSK'un da bu şekilde geliştiği düşünülmektedir, fakat yine de kronik HCV enfeksiyonundan HSK gelişmesi mekanizması tam olarak net değildir (23, 67).

Akut Hepatit C

Akut hepatit C'nin klinik bulguları oldukça değişkendir. Genellikle asemptomatik olmakla birlikte, hastaların yaklaşık %20-30'unda bulantı, kusma, sağ üst kadranda ağrısı, idrar renginde koyulaşma ve sarılık gibi diğer hepatit formlarından farklı olmayan bulguları vardır. İnkübasyon periyodu yaklaşık yedi hafta kadardır, ancak bazı viral göstergeler semptomların başlangıcından çok daha önce ortaya çıkmaktadır. Temastan sonraki yaklaşık 1-2 hafta içinde kanda HCV RNA saptanabilir ve benzer zaman içinde serum ALT düzeyleri artmaya başlar. Bundan bir süre sonra semptomlar belirmeye başlar. Semptomatik olan hastalarda şikayetler yaklaşık 2-12 hafta kadar sürmekte sonra yavaş yavaş kendiliğinden kaybolmaktadır. Anti-HCV antikörleri ise yaklaşık üç ay sonra saptanabilmektedir. Akut hepatit C çok nadiren fulminan seyir gösterirken genellikle kronik enfeksiyona ilerler (68).

Kronik Hepatit C

HCV enfeksiyonu tanısı konduktan en az altı ay sonra enfeksiyonun devam etmesi ve kanda HCV RNA saptanması ile kronik hepatit C tanısı koyulur (66). HCV enfeksiyonunun kronikleşmesini yaş, ırk, yaşam tarzı gibi faktörlerin etkilemesi ile birlikte yaklaşık %70-85 arasındadır (69). Enfeksiyonun akuttan kroniğe geçişi sırasında HCV RNA ve ALT düzeyinde dalgalanmalar görülebilir, fakat bazı

hastalarda negatif HCV RNA ve normal ALT düzeylerine rastlanabilmektedir. Kronik hepatit C hastalarının şikayetleri genellikle olmamakla birlikte çok az bir kısmında belli belirsiz şikayetler olabilir. Siroz gelişmesi genellikle sessiz olduğundan, çoğu hastada son dönem karaciğer hastalığı veya HSK geliştikten sonra HCV enfeksiyonunun farkına varılmaktadır. HCV az gelişmiş ülkelerde akut hepatitin %20'sini, kronik hepatitin %70'ini, son dönem karaciğer sirozunun %40'ını ve karaciğer transplantasyonu yapılan hastaların %30'unu oluşturmaktadır (67, 68).

Siroz ve Sirozun Dekompansasyonu

Siroz geliştikten sonra her hastada ilerleyiş hızı farklı olmakla birlikte asit, sarılık, hepatic ensefalopati, varis kanaması ile karakterize olan dekompanse sirozlu hastalarda albümin ve trombosit düzeylerinde düşme olması ve AST/ALT oranında artış olması durumunda dekompanse sirozlu hastalarda geliştiği akla gelmelidir (70).

Okült Hepatit C

Kanda HCV tespit edilemezken, periferik kan monolükleer hücrelerinde ve karaciğerde HCV RNA saptanması ile karakterize bir tablodur. HCV her ne kadar hepatotropik bir virüs olsa da periferik kan monolükleer hücrelerinde de çoğalabilmektedir. Seronegatif okült hepatit C (anti-HCV ve HCV RNA negatif) ve seropozitif okült hepatit C (anti-HCV pozitif, HCV RNA negatif) olmak üzere iki şekilde karşımıza çıkmaktadır. Anormal karaciğer fonksiyon testi olan fakat HCV RNA'sı negatif olan hastalarda akla gelmelidir. Okült hepatit C, kronik hepatit C'den daha az karaciğer hasarına sebep olur ve daha az agresif seyredir (71).

Hepatoselüler Karsinom

Kronik HCV enfeksiyonunda ortaya çıkan inflamasyon, nekroz, rejenerasyon ve siroz onkogeneze gelişimine zemin hazırlamaktadır. HCV'nin hem yapısal hem yapısal olmayan proteinleri HSK gelişimiyle ilgilidir, bunlardan en çok C proteini ve NS5A proteini öne çıkmaktadır (72).

HSK, kronik hepatit C'nin geç dönem komplikasyonudur ve her yıl yaklaşık hastaların %2-5'inde HSK gelişir ve sirozlu hastalarda HSK gelişme riski daha yüksektir (73). Spesifik olarak serum alfa-fetoprotein (AFP) düzeyi yüksektir (74).

Ekstrahepatik Bulgular

HCV enfeksiyonu sırasında oluşan immünkomplekslere bağlı karaciğer dışı birçok klinik tablo ortaya çıkabilir. En sık karşımıza çıkan ekstrahepatik bulgular; mikst esansiyel kriyoglobülinemi, Raynaud fenomeni, Sicca sendromu, liken planus, tip 2 diyabet, sistemik vaskülit, periferik nöropati ve membranoproliferatif glomerulonefrittir. Doğrudan etkili antivirallerin kullanılmasıyla bu ekstrahepatik bulgularda azalma ve bunlara bağlı ölümlerde azalma olacağı düşünülmektedir (75)

Laboratuvar Tanı Yöntemleri

Hücre Kültürü

HCV'yi üretebilen hücre kültür sistemi olmaması HCV hakkında ilerlememizi ve bilgi edinmemizi engellemiş, aşı çalışmalarını kısıtlamıştır. 2003 yılında Wakida ve arkadaşları, Japonya'da, bir fulminan hepatit hastasından klonlanmış HCV JFH-1 suşu kullanarak, HCV'yi hücre kültüründe üretmeyi başarmıştır (76).

HCV'nin hücre kültüründe üretilmesinden sonra, doğrudan etkili antivirallerin geliştirilmesi kolaylaşmıştır. IFN içermeyen doğrudan etkili antiviral tedavisi, HCV'yi yüksek ölçüde ortadan kaldırmakta, daha az yan etkisi olmakta ve daha kısa bir tedavi süresi sunmaktadır (77).

Laboratuvar Testleri

Kullanım amacına göre; tarama testleri (EIA ve CLIA (Kemilüminesans İmmün Analiz) tabanlı Anti-HCV testleri), tamamlayıcı (supplemental) testler (Strip immunoblot testler) ve konfirmasyon testleri (HCV RNA) olarak sınıflandırılır.

İdentifikasyon metoduna göre ise; indirek testler (Anti-HCV ve Strip immunoblot testler) ve direk testler (HCV RNA, HCV kor antijen, HCV genotipleme testleri) olarak sınıflandırılır (78).

Anti-HCV testleri

Anti-HCV antikorları HCV ile enfekte olduktan yaklaşık 2-8 hafta sonra ortaya çıkar ve yaşam boyu devam eder. Anti-HCV antikorları ortaya çıkmadan önce HCV

RNA ve kor antijen testlerinin saptanabildiği döneme serolojik pencere denir ve yaklaşık 60 gün sürmektedir (79).

Vücut sıvılarında spesifik antikorların tespiti ve miktarının belirlenmesinde genellikle enzimatik reaksiyon (EIA veya enzim bağlantılı immünosorbent analiz (ELISA)) veya ışık emisyonu (CLIA) tabanlı testler kullanılır (80).

Üç farklı kuşak anti-HCV antikor testi vardır. Bu testlerden antijen olarak virüsün yapısal olmayan NS4 proteininin rekombinant c100-3 epitopunu kullanan birinci nesil HCV EIA'dır. Bu testin duyarlılık ve özgüllüğü ikinci ve üçüncü kuşak testlere göre daha düşüktür. Birinci kuşağa yapısal olmayan NS3 proteininin rekombinant epitopu c33c ve yapısal C proteininin epitopu c22-3'ün eklenmesiyle ikinci kuşak HCV EIA ve ikinci kuşak HCV EIA'ye yapısal olmayan NS5 bölgesinin bir rekombinant epitopu eklenmesiyle üçüncü kuşak HCV EIA testleri ortaya çıkmıştır.

Birinci nesil EIA testleri ile bulaşın yaklaşık 16. haftasında pozitiflik saptanırken, ikinci nesil EIA testleri ile 10. haftasında pozitiflik saptanır. Üçüncü nesil EIA testlerin ise bu süre yaklaşık sekizci haftada pozitiflik saptayabilir. Ayrıca üçüncü kuşak HCV EIA testlerine HCV kapsid antijenini de saptayan HCV cor antijen testinin de eklenmesiyle dördüncü kuşak EIA testleri ortaya çıkmıştır. Diğer EIA testlerine kıyasla bu testle birlikte bulaştan yaklaşık beş hafta sonra HCV antijen ve antikorların saptanabildiği bildirilmiştir (81).

Strip immunoblot testler

Strip immunoblot testler HCV viral antijenleri ile kaplanmış nitroselülez stripleri kullanarak spesifik antikorları tespit eder. Bunlardan en yaygın olanları rekombinant immünbloz analiz (RIBA) ve INNO-Line Immün Assay (LIA)'dır. RIBA testinde iki ve üzeri sayıda bandın görünmesi pozitif, bir bandın görülmesi belirsiz, hiç bandın görülmemesi negatif olarak değerlendirilir. Bu testin ikinci kuşağında antijen olarak rekombinant proteinlerden c22-3, c33-c ve c100-3 kullanılmakta bunlara NS5 eklenmesiyle üçüncü kuşak RIBA testi geliştirilmiştir. Üçüncü kuşak testin geliştirilmesiyle her ne kadar belirsiz değerler önemli oranda azalsa da yine bir

doğrulama testi gerekeceğinden Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2003 yılından itibaren RIBA testinin kullanılmasını önermemektedir (82).

Hızlı immünokromatografik test

Son yıllarda anti-HCV tespitinde hızlı hasta başı testler geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan OraQuick HCV testi Food and Drug Administration (FDA) tarafından onay almıştır. Bu testte örnek olarak venöz tam kan ve parmak ucu kanı kullanılabilir ve 20-40 dakikada sonuç verir. Tarama amacıyla üçüncü kuşak EIA testine alternatif olarak kullanılabilir fakat pozitif çıkması halinde doğrulama testi yapılmalıdır (82).

HCV kor antijen testi

HCV kor antijen (HCV-cAg) testi HCV-RNA testinin pozitifleşmesinden yaklaşık 1-2 gün sonra yani temastan yaklaşık 28 gün sonra pozitifleşmektedir. Üçüncü kuşak antikor testlerinin pozitifleşme zamanı düşünülürse pencere dönemini önemli ölçüde kısaltmaktadır. Yapılan çalışmalarda HCV-cAg testinin HCV-RNA testleriyle yüksek korelasyon gösterdiği ve HCV-RNA testinin yapılamadığı durumlarda onun yerine kullanılabileceği belirtilmiştir (82).

HCV RNA Testleri

HCV enfeksiyonundan şüphelenildiğinde ilk yapılan test EIA prensibiyle çalışan anti-HCV testleridir. Ancak bu testler geçirilmiş bir enfeksiyon mu yoksa devam eden bir enfeksiyon mu olduğunu göstermez. Replikasyon göstergesi olan ve aktif enfeksiyonu gösteren HCV RNA'nın çalışılması HCV enfeksiyonu için en önemli testtir (6). HCV RNA ilk ortaya çıkan ve replikasyonun direk belirteci olan testtir. Kandaki HCV RNA testi enfeksiyondan 1-2 hafta sonra, anti-HCV antikorları yükselmeden ve karaciğer enzimleri değişmeden tespit edilebilir seviyelere yükselir (7).

Hedef amplifikasyon yöntemleri (RT-PZR, TMA (Transcription-Mediated Amplification)) ve sinyal amplifikasyon yöntemleri (bdNA, (brancedDNA), dallı DNA) ile serumda kalitatif veya kantitatif olarak HCV RNA saptanabilmektedir (83).

Kalitatif HCV RNA Testleri

Bu testler sadece viral genomun varlığını veya yokluğunu tespit etmede kullanılmakta ve sayısal bir değer vermemektedir. Özellikle akut enfeksiyonların tanısı ve transfüzyon güvenliğinin sağlanması amacıyla kullanılmaktadır. Üçüncü kuşak EIA testlerine göre pencere dönemini önemli ölçüde kısalttığı bildirilmiştir (18). Kalitatif HCV RNA testleri klasik PZR, RT-PZR ya da TMA tekniğine dayanmaktadır (83).

Kantitatif HCV RNA Testleri

HCV RNA kantitatif testlerde her ml başına virüs miktarı verdiği için viral yük tayin yapmak için kullanılan testlerdir. Bu testler genellikle immün sistemi zayıf hastalarda ve hastalık seyrinin takibinde kullanılan testlerdir.

Viral yük takibinin yapılabilmesi ve hastanın önceki değerleriyle karşılaştırılabilmesi için sonuçların IU/mL biriminde ve logaritmik değerleri ile birlikte verilmesi önemlidir.

HCV viral yükünü ölçmek için PZR yönteminin değişik uygulamaları geliştirilmiş ve rutin laboratuvarlarda kullanılmaya başlanmıştır (7). Bunlar arasında dünya genelinde en yaygın kullanılan RT-PZR ve TMA tabanlı testlerdir. RT-PZR ile çok düşük miktarlarda viral yük kanda saptanabilmektedir. Özellikle antiviral tedavinin izlenmesinde viral yük tayininin gösterilmesi önemli olduğu için PZR yönteminin önemi büyüktür (84).

HCV Genotiplendirme Testleri

HCV enfeksiyonu olan kişilerde hastalığın prognozu ve tedavi planlanması için HCV genotip tayini önemlidir. Genotip tayini için HCV genomunun dizilenmesi ve sonra sekans analizi yapılması altın standart olarak kabul edilmektedir (25). Ancak rutin laboratuvar ortamında dizileme yöntemi, yüksek maliyetli ve emek yoğun bir yöntem olması nedeniyle çok tercih edilmemektedir. Bu nedenle PZR temelli bazı yöntemler, genotip testlerinde daha yaygın kullanılmakta ve sekanslama, referans laboratuvarlara bırakılmaktadır.

Genotipe özgü primerler kullanılarak, kor ya da NS5B bölgeleri hedef alınarak yapılan RT-PZR, 5'UTR bölgesinin PZR ile çoğaltılması sonrasında restriction fragment length polymorphism (RFLP) yöntemi ve 5'UTR, kor, E1, NS3 ya da NS5B'nin hedef alınarak PZR ile çoğaltılması sonrasında ters hibridizasyon yöntemi gibi PZR temelli testler günümüzde sıklıkla tercih edilmektedir. Bunun dışında EIA yöntemi kullanılarak C, E1, ya da NS4 bölgesi peptidleri ile yapılan serotiplendirme de kullanılan yöntemlerden biridir (25).

HCV genotip için kullanılan testlerden biri de revers dot-blot hibridizasyon prensibine dayalı olan "line probe assay"dir. 5'UTR'nin bir bölgesinin biyotinlenmiş PZR ürünlerinin nitro selüloz şeritler üzerindeki tipe özgü problarla hibridizasyonu esasına dayalı bir DNA hibridizasyon testidir (88, 89). Bu amaçla geliştirilmiş iki kit, VERSANT™ HCV Genotype Assay ve Inno-LIPA HCV II, HCV'nin birçok genotipini alttıpleri ile birlikte kolayca saptama imkanı sağlamaktadır (9, 86).

miRNA

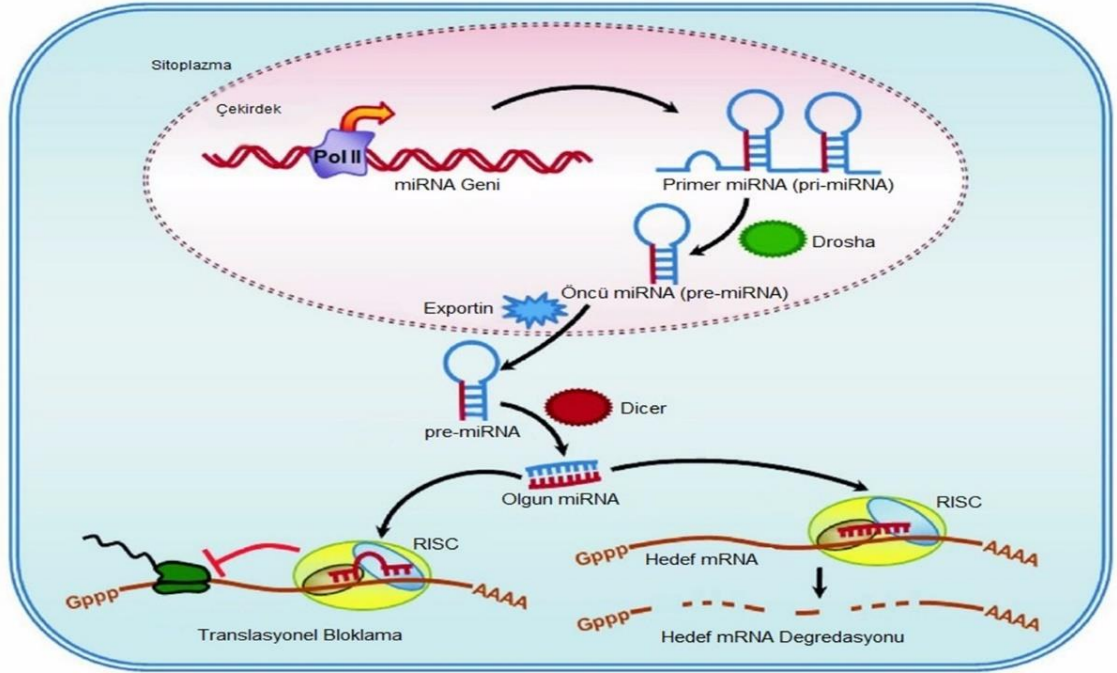
İnsan genom projesiyle insan genomunun yaklaşık %2'si ile 20.000 protein kodladığı keşfedilmiştir. Bu keşifle beraber toplam genomun %90'ından fazlasının aktif olarak transkribe edilmesine rağmen tümünün protein kodlamadığı anlaşılmış ve bu kısımlar non-coding RNA (ncRNA) olarak isimlendirilmiştir. Uzun süre evrimsel çöp olarak kabul edilen ncRNAlar hakkındaki çalışmalar bunların bir kısmının fonksiyonel olabileceğini ortaya koymuştur. ncRNAlar uzunluklarına göre küçük kodlanmayan RNA (scnRNA, 18-200 nükleotid) ve uzun kodlanmayan RNA (lncRNA, >200 nükleotid) olarak iki alt sınıfa ayrılırlar. ncRNAların bir kısmı işlevsel RNAlardır, Bunlar ribozomal RNAlar ve transfer RNAlardır. ncRNAların diğer bir kısmı ise düzenleyici RNAlardır. Bu düzenleyici ncRNAlar içinde miRNAlar, PIWI etkileşimli RNAlar (piRNA), küçük nükleolar RNAlar (snoRNA), küçük susturucu RNAlar (siRNA), dairesel RNAlar (circRNA), lncRNAlar bulunur (87).

miRNA'lar 1993 yılında Victor Ambros ve ekibi tarafından, bir nematod olan *Caenorhabditis elegans* 'ta keşfedilmiştir. Larva gelişiminin zamanlamasını kontrol ettiği bilinen lin-4 geninin bir proteini kodlamadığını bunun yerine bir çift küçük RNA

ürettiğini keşfetmişler (88). İnsan genomunda 2000'den fazla miRNA olduğu ve insan mRNA'sının %60'ının bu miRNA'ların hedefi olabileceği düşünülmektedir (89). Bu protein kodlamayan 18-22 nükleotid uzunluğundaki miRNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik rol oynarlar (91). Tek bir miRNA birden fazla geni etkileyebileceği gibi, tek bir gende birden fazla miRNA tarafından etkilenebilir. Ayrıca miRNAlar doku ve organa özgü olabilir (95). miRNA'lar konak genlerinin düzenlenmesi haricinde hücrel gelişim, farklılaşma, proliferasyon, metabolizma, immünite ve ölüm gibi birçok yollardaki birçok olayla ilişkilendirilmiştir (92).

miRNA biyogenezi

miRNA'lar, birincil miRNA'yı (primer, pri-miRNA) oluşturmak için konakçı miRNA genlerinden RNA polimeraz II tarafından endojen olarak çekirdekte sentezlenir. Yaklaşık 200 nükleotid uzunluğunda olan bu pri-miRNA'lar RNAz III enzimi olan Drosha ve onun kofaktörü DiGeorge syndrome critical region 8 (DCGR8) tarafından kesilerek 70 ila 100 nükleotid uzunluğunda öncü miRNA (prekürser, pre-miRNA)'ya dönüşürler. Pre-miRNA'nın iki nükleotidlik 3' bölgesini tanıyan ve bağlayan kofaktör RAS ile ilişkili nükleer protein (RAN)'nın GTP bağlı formu ve exportin 5'ten oluşan kompleksi tarafından pre-miRNA sitoplazmaya taşınır. Daha sonra sitoplazmada pre-miRNA sitoplazmik bir RNAz III enzimi olan Dicer tarafından kesilerek 18-25 nükleotidlik miRNA dublekslerine dönüşürler. miRNA'lar daha sonra miRISC'yi oluşturmak için RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) adı verilen daha büyük bir protein kompleksi içinde bir Argonaute proteini (Ago) ile birleşir. miRNA dubleksleri, Ago tarafından çözülür ve geriye kalan olgun tek iplik, miRISC'yi mRNA'ların 3'NCR'sindeki kısmen tamamlayıcı bağlanma bölgelerine yönlendirir (93). miRNA hedef bağlanmasının temel belirleyicisi, miRNA'nın 2-8 nükleotidlik dizileri ve 13-16 nükleotidlik yardımcı dizileri ile tamamlayıcılığıdır. miRISC ilişkisi, mRNA translasyon baskılanması ve bozulmasıyla sonuçlanır (94). miRNA'lar genellikle hedef mRNA'ların 3'NCR bölgelerine bağlanarak gen ekspresyonunu baskırlarken; miRNA'ların ayrıca 5'NCR bölgelerine bağlanarak da gen ekspresyonunu baskıladığı veya aktive ettiği gösterilmiştir (Şekil 3) (12).



Şekil 3. miRNA biyogenezini (95)

Belirteç Olarak miRNAlar

Mitchell ve ark. 2008 yılında yaptıkları çalışmada endojen miRNA'ların kanda stabil olduklarını ve RNAz enzimleri tarafından yıkılmadıklarını göstermişlerdir. Böylelikle miRNA'ların hastalıkların teşhisinde belirteç olarak da kullanılabileceği düşünülmüştür (13). miRNA'lar plazma, tükürük, idrar, süt gibi 12 farklı vücut sıvısında stabil olarak izole edilebilmiştir. Böylelikle miRNA'ların belirteç olarak kullanılabileceğine dair çalışmalar hız kazanmıştır (96).

Karaciğer çeşitli hücre tiplerinden (parankimal hepatositler, parankimal olmayan safra epitel hücreleri, lenfoid hücreler, vb.) oluşur. Her hücre tipinde sentezlenen miRNA profili farklıdır. miRNAlar, düzeylerinin değişimiyle, hepatik gelişimin hemen her aşamasında hücre proliferasyonunu artırarak veya azaltarak rol oynarlar. Ayrıca çeşitli karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesinde de önemlidirler. Karaciğerde toplam 277 miRNA'nın eksprese edildiği gösterilmiştir. miR-122 en fazla sentezlenen ve karaciğere özgü miRNA'lardan biridir (97). Karaciğerdeki miRNA ekspresyonlarının incelenmesi ile HCV ve HBV ile enfekte karaciğer hastalığının farklı evreleriyle ilişkili spesifik miRNAlar tanımlanmıştır (98, 99). Doku örneklerinden miRNA ölçümü invaziv bir işlem gerektirmesi ve bunun

komplasyonları nedeniyle makul değildir. Karaciğerdeki miRNA'ların apoptoz ve nekroz sonucunda pasif, eksozom ve viral partikül salgılanması sonucu aktif olarak seruma geçebilir (100). Bazı miRNA'ların serumdaki seviyelerinin karaciğerdeki miRNA seviyeleri ile ilişkili olduğu gsterilmiştir (101). Bu nedenlerle serumdan miRNA dzeylelerinin olümü diğer yntemlere g-re daha uygundur.

18. insan kromozomundan sentezlenen miRNA-122, karaciğer homeostazı, yağ metabolizmasında, hepatokarsinogenezinde kritik bir rol oynadığı gsterilmiştir. HCV genomunun replike olması için miRNA-122'ye ihtiyaı vardır. miRNA-122 HCV genomunun 5'NCR b-lgesindeki IRES b-lgesine bağlanarak HCV genomunun bozulmasına karşı koruma sağlar ve b-ylece HCV replikasyonunu destekler. miRNA-122, eksoribonkleaz 2'nin HCV 5'NCR ile etkileşimini inhibe eder ve b-ylece viral genomu eksoribonkleaz 2 tarafından bozulmasını engeller. Biyoinformatik alışmalar HCV genomunda NS5B ve 3'NCR b-lgerinde miRNA122'nin bağlanabileceği farklı b-lgeler -ng-ormuş ancak bunun HCV yaşam d-ng-üsüne etkisi tespit edilememiştir. HCV miRNA-122'ye bağlanarak hem miRNA-122'nin hem de sentezi miRNA-122'ye bağlı miRNAların hücre içi konsantrasyonlarını azaltabilir. Ayrıca miRNA-122 Nuclear Factor kappa B (NF-kappa B, NF-kB) ind-ükleyici kinaz proteininin sentezine etki ederek fibrozisi önler. Bunun yanında metalloprotease 17 proteinini, siklin G1 ve WNT yolaklarını etkileyerek karsinogenezden koruyucu etki gsterir (15, 89, 97).

miRNA 155 21. insan kromozomundan sentezlenip immün yanıtta, hematolojik bozukluklarda, kardiovasküler hastalıklarda ve tümorogenezde rol oynadığı bilinmektedir (102). İnsan monositleriyle yapılan in vivo alışmalar HCV kor, NS3B, NS5B proteinlerinin monositlerde miRNA 155 sentezini arttırdığını gstermiştir. miRNA 155'in tümör nekrozis faktör α 'yı artırarak virüse verilen immün yanıt başlangıcında önemli bir rol oynadığı d-şün-ölmektedir. Bunun yanında NK hücrelerindeki IFN- γ üretimini d-zenleyerek immün hasar ile immün temizleme arasındaki dengenin sağlanması rol oynadığı gsterilmiştir. Ayrıca miRNA-155'in hepatokarsinogenezde de önemli rol oynadığı d-şün-ölmektedir. Hem β -katenini ind-ükleyerek hücre proliferasyonun arttıran siklin-d1 gibi proteinleri arttırırken, adenopoliposis koli proteininin wnt sinyal yolağı baskılamasını engelleyerek onkojenik etki gstermektedir (15). Yapılan alışmalar HSK evrelemesi ile ilişkili Phosphatase

And Tensin Homolog (PTEN) gen ekspresyonunun azalmasında miRNA-155 artışının rol oynadığını göstermiştir (102).

miRNA-21 insan genomunun 17. kromozomundan sentezlenir ve tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonunda rol oynayarak pek çok dokunun karsinogenezinde önemli rol oynar (97). miRNA-21 PTEN ekspresyonu üzerindeki etkisiyle hücrenin G1/S geçişinde rol oynar ve karaciğer rejenerasyonunun önemli bir düzenleyicisidir (103). HCV enfeksiyonu sırasında miRNA-21'in IFN ekspresyonunun ve ardından gelen antiviral yanıtı engellediğini gösteren çalışmalar vardır (15). Çalışmalar miRNA-21'in hem hepatik stellat hücreleri aktive ederek hem de TGF- β 'nın yıkılmasını önleyerek fibroziste önemli rol oynadığını göstermiştir (15, 97). miRNA-21'in PTEN'i hedefleyerek Fosfatidilinozitol bağımlı kinaz 1 (PDK1)/AKT sinyal aktivasyonu ile HSK hücrelerinin vasküler endotelial büyüme faktörü, bazik fibroblast büyüme faktörü, TGF- β , matris metalloproteinaz 2 ve 9 gibi anjiyojenik molekülleri salgılamasına neden olarak kanser ilerlemesini teşvik ettiğini göstermiştir (103).

miRNA-224 X kromozomundan sentezlenir ve karsinogeneizde önemli rol oynadığı bilinmektedir. MiRNA-224 SMAD4 genini susturarak HSK gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca hücre siklusunda görevli p21 ve p27 proteinlerinin ekspresyonlarını kısıtlayarak hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir ve bu yolak üzerindeki etkisiyle HSK'da migrasyona ve invazyona neden olduğu bilinmektedir. Bunların da yanında metalloproteinaz 9 ve p21-Activated kinase 4 (PAK4) proteinleri ekspresyonlarını azaltarak kanserleşmiş hepaotositlerin migrasyon ve invazyon yeteneklerini arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (104). Yapılan çalışmalar sadece HSK'da değil sirotik karaciğer dokularında, hepatoselüler adenom gibi iyi huylu karaciğer adenomlarında ve hatta kronik hepatitte miRNA-224 ekspresyonunun arttırdığını göstermiştir (105)

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı ve Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna başvuruda bulunarak 26.07.2022 tarihli 11 sayılı onay kararı alınmıştır.

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına HCV RNA istemiyle gelen kan örneklerinden pozitif tespit edilenlerin plazma örneklerinde HCV genotip tayini çalışıldı. Kalan total RNA ekstraksiyon örneğinden RT-PZR çalışıldı. Kontrol grubunda ise serum örneklerinde anti-HCV testi; plazma örneklerinden ise total RNA izolasyonu, ardından RT-PZR çalışıldı. Çalışmada miRNA-122, miRNA-155, miRNA-224 ve miRNA-21 gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre ve farklı genotipler arasındaki rölatif değişimleri incelendi. “Housekeeping” gen olarak U6 kullanıldı.

HASTALAR ve KONTROL GRUBU

Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına 22.06.2022/10.01.2023 tarihleri arasında HCV RNA istemi ile gelen kan örneklerinden HCV RNA pozitif çıkan, 18-60 yaş arası, başka sistemik ya da karaciğer hastalığı olmayan 50 kişi, hasta grubu olarak seçildi. Hasta grubunun plazma örneği ve HCV RNA testi sırasında artan ekstraksiyon numunesi daha sonra çalışılmak üzere ayrıldı ve -80°C’de saklandı.

Kronik hastalığı olmadığı bilinen 18-60 yaş arası 50 gönüllü kişiden kontrol grubu oluşturuldu. Kontrol grubundan Helsinki bildirgesine göre bilgilendirilip onam formu imzalatıldıktan sonra Etilendiamintetraasetik asit(EDTA)’lı ve biyokimya tüplerine kan örnekleri alındı.

Hastaların demografik özelliklerine ve AST, ALT, ALP değerlerine hastane bilgi sistemi kullanılarak erişildi. Kontrol grubunun AST, ALT, ALP değerleri biyokimya tüperine alınan kanlardan elde edilen plazmanın bir kısmı Cobas modüler analizör serisinde (Roche, ABD) cihazında Cobas kitleri (Roche, ABD) ile çalışıldı.

ANTİ HCV TESTİ

Kontrol grubunun biyokimya tüplerinden anti-HCV testi yapıldı. Kan tüpleri 30 dakika bekletilip 4000 rpm (dakikadaki devir sayısı)10 dakika santrifüj edildi. Test çalışılana kadar +4°C’de bekletildi. Test için ARCHITECT i2000SR cihazı (Abbott Laboratories, ABD) ve ARCHITECT Anti-HCV kiti (Abbott Laboratories, ABD) kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda ELISA laboratuvarında rutin olarak çalışıldı. Değerlendirmede cihaz, kalibratörün ortalama relative light units (RLU) değerini 0,074 katsayıyla çarparak cut-off RLU değeri elde edildi. Sonuçlar, numune RLU değerini hesaplanan cut-off RLU değerine bölerek elde edilen Sample/Cut off (S/CO) üzerinden değerlendirildi. S/CO değeri <1.0 ise nonreaktif; ≥1 ise reaktif olarak değerlendirildi.

Kullandığımız sistem, serumda HCV’nin yapısal olmayan NS3 ve NS4 proteinlerine ve kor proteinine karşı oluşan anti-HCV antikorlarını, HCr43 ve c100-3 rekombinant proteinlerini kullanarak kantitatif olarak saptayabilen kemilüminesans mikropartikül immün analiz (chemiluminescence microparticule immunoassay; CMIA) yöntemidir.

KANTİTATİF HCV RNA TESTİ

Moleküler laboratuvarımıza HCV RNA istemi ile EDTA’lı kan tüplerinde gelen örnekler 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen plazmanın bir kısmı genotip çalışılması için -20°C’de saklandı. Plazma örneği Cobas 4800 Systems (Roche, ABD) cihazında, Cobas HCV Test (Roche, ABD) kiti ile çalışıldı. Test kiti RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PZR reaksiyonu için gerekli reaktifleri içeriyordu. Kit içeriği tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. HCV RNA testi kit içeriği

Cobas HCV Kiti	Master Mix Reaktif 1 (MMX R1) (manganaz asetat, potasyum hidroksit, sodyum azid)
	HCV Master Mix Reaktif 2 (MMX R2) (Trisin tampon, potasyum asetat, potasyum hidroksit, dimetil sülfoksit, gliserol, Tween 20, EDTA, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, HCV primerleri, kantitasyon standartı primerleri, HCV ve kantitasyon standartına spesifik floresan boyalı oligonükleotid problemleri, oligonükleotid aptamerleri, Z05 DNA polimeraz, AmpErase enzimi, sodyum azid)
	RNA Kantitasyon Standartı (RNA QS) (Tris tamponu, EDTA, Primer ve proba özgü sekans bölgeleri içeren HCV ile ilgili olmayan zırlı RNA yapısı, sodyum azid)
Cobas Kontrol Kiti	Düşük Pozitif Kontrol (MS2 bakteriyofaj kılıf proteininde kapsüllenmiş sentetik (zırlı) HCV RNA, HCV antikor, HBsAg antikor, HBe antikor için lisanslı testlerle reaktif olmayan; PZR yöntemleri ile HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA ve HBV DNA saptanamayan normal insan plazması, ProClin 300)
	Yüksek Pozitif Kontrol (MS2 bakteriyofaj kılıf proteininde kapsüllenmiş sentetik (zırlı) HCV RNA, HIV 1/2 antikor, HCV antikor, HBsAg antikor, HBe antikor için lisanslı testlerle reaktif olmayan; PZR yöntemleri ile HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA ve HBV DNA saptanamayan normal insan plazması, ProClin 300)
	Negatif Kontrol (HIV 1/2 antikor, HCV antikor, HBsAg antikor, HBe antikor için lisanslı testlerle reaktif olmayan; PZR yöntemleri ile HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA ve HBV DNA saptanamayan normal insan plazması, ProClin 300)
Cobas Örnek Hazırlama Kiti	Manyetik Cam Partikülleri Reaktifi (Manyetik cam partikülleri, izopropanol)
	Elüsyon Tampon (Tris tampon, metil paraben)
Cobas Yıkama Tampon Kiti	Yıkama Tamponu (Sodyum sitrat dihidrat, metil izotiyazolinone)
Cobas Örnek Dilüsyonu	SD (Tris tampon, metil paraben, sodyum azid)
Cobas Lizis Kit	Proteaz (Tris tampon, EDTA, kalsiyum klorid, kalsiyum asetat, proteinaz)
	Lizis Tamponu (Sodyum sitrat dihidrat, guanidin tiyosiyanat, polidokanol, ditiyotritol)

Üretici firmanın protokolüne göre örnekler çalışıldı. Cihaz örnekler ve kontroller için HCV RNA konsantrasyonunu otomatik olarak belirlemektedir.

Cobas HCV Kit saptama sınırı, genotip 1a için HCV RNA'ya yönelik WHO Uluslararası Standardının seri dilüsyonlarının analizi ile 400 µl ve 200 µl numune hacimleri kullanılarak plazma ve serumda belirlenmiştir. Kitin saptama sınırı serum ve plazmada 400 µl için 9,2 IU/mL ve 200 µl için 15,3 IU/mL olarak belirlenmiştir.

Çalışma sonunda cihaz içindeki ilgili kısımdan her örneğe ait izole edilmiş total RNA farklı tüplere alınarak -80°C'de miRNA çalışmaları için saklandı.

HCV GENOTİP TAYİNİ

HCV genotip tayini için ayrılan plazmalardan Cobas 4800 Systems (Roche, ABD) cihazında, Cobas HCV GT (Roche, ABD) kiti ile çalışıldı. Test kiti RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PZR reaksiyonu için gerekli reaktifleri içeriyordu. Kit içeriği tablo 4'te verilmiştir.

Üretici firmanın protokolüne göre örnekler ve kit bileşenleri cihaza yerleştirildikten sonra cihaz çalıştırıldı. Cihaz örnekler ve kontroller için HCV genotip tayinini otomatik olarak belirlemektedir.

Cobas HCV GT kit, HCV enfeksiyonu olan kişilerden elde edilen insan plazması veya serumunda HCV genotipleri 1 ile 6 ve genotip1 alt tipleri A ve B'nin kalitatif tayinine yönelik bir yüksek duyarlılığa sahip, gerçek zamanlı PZR testidir.

Cobas HCV GT, dizilemeye benzer düzeyde bir genotipleme ve alt tiplene doğruluğu elde etmek ve karma enfeksiyonlarda her iki genotipi de 1:100'lük bir oranda saptayabilmek için HCV genomundaki üç farklı hedef bölgeyi(5'-UTR, Core, NS5B) kullanmaktadır.

Tablo 4. HCV RNA tayini kit içeriği

Cobas HCV GT Kiti	Master Mix Reaktif 1 (MMX R1) (manganaz asetat, potasyum hidroksit, sodyum azid)
	HCV GT Master Mix Reaktif 2A (HCV GT MMX R2A) (Trisin tampon, potasyum asetat, potasyum hidroksit, dimetil sülfoksit, gliserol, Tween 20, EDTA, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, HCV primerleri, floresan boyalı oligonükleotid problemleri, oligonükleotid aptamerleri, poliadenilic asit, Z05 DNA polimeraz, AmpErase enzimi, sodyum azid)
	HCV GT Master Mix Reaktif 2B (HCV GT MMX R2B) (Trisin tampon, potasyum asetat, potasyum hidroksit, dimetil sülfoksit, gliserol, Tween 20, EDTA, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, HCV primerleri, floresan boyalı oligonükleotid problemleri, oligonükleotid aptamerleri, poliadenilic asit, Z05 DNA polimeraz, AmpErase enzimi, sodyum azid)
	HCV GT Master Mix Reaktif 2C (HCV GT MMX R2C) (Trisin tampon, potasyum asetat, potasyum hidroksit, dimetil sülfoksit, gliserol, Tween 20, EDTA, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, HCV primerleri, floresan boyalı oligonükleotid problemleri, oligonükleotid aptamerleri, poliadenilic asit, Z05 DNA polimeraz, AmpErase enzimi, sodyum azid)
Cobas Genotip Kontrol Kiti	Pozitif Kontrol (MS2 bakteriyofaj kılıf proteininde kapsüllenmiş sentetik (zırhlı) HCV RNA, HIV 1/2 antikoru, HCV antikoru, HBsAg antikoru, HBc antikoru için lisanslı testlerle reaktif olmayan; PZR yöntemleri ile HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA ve HBV DNA saptanamayan normal insan plazması, ProClin 300)
	Negatif Kontrol (HIV 1/2 antikoru, HCV antikoru, HBsAg antikoru, HBc antikoru için lisanslı testlerle reaktif olmayan; PZR yöntemleri ile HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA ve HBV DNA saptanamayan normal insan plazması, ProClin 300)
Cobas Örnek Hazırlama Kiti	Manyetik Cam Partikülleri Reaktifi (Manyetik cam partikülleri, izopropanol)
	Elüsyon Tamponu (Tris tampon, metil paraben)
Cobas Yıkama Tampon Kiti	Yıkama Tamponu (Sodyum sitrat dihidrat, metil izotiyazolinone)
Cobas Lizis Kit	Proteaz (Tris tampon, EDTA, kalsiyum klorid, kalsiyum asetat, proteinaz)
	Lizis Tamponu (Sodyum sitrat dihidrat, guanidin tiyosiyanat, polidokanol, ditiyotreitil)

KONTROL GRUBU TOTAL RNA EKSTRAKSİYONU

Kontrol grubunun EDTA'lı tüpleri 3000 rpm 10 dakika santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Test çalışılana kadar -20°C'de saklandı. Plazmadan viral RNA'nın izolasyonu EZ-1 Virus Mini Kit v2.0 (QIAGEN, Almanya) ile manyetik-parçacık teknolojisi kullanan EZ-1 Advanced cihazında (QIAGEN, Almanya) yapıldı. Örnekler

firmanın önerdiği protokol ile çalışıldı. Birinci sıraya elüsyon tüpleri (1,5 ml) yerleştirildi. İkinci sıraya fitreli uç içeren tip holder yerleştirildi. Daha sonra Buffer AVE'den 56 µl ve carrier RNA'dan 4 µl içeren toplam 60 µl karışım hazırlandı ve üçüncü sıraya yerleştirildi. Dördüncü sıraya örnek tüpleri yerleştirildi ve her örnekten 400 µl eklendi. Reaktif kartuşlar, kartuş raflarına yerleştirildi. 2 ml'lik tüpler sıcak bloklara yerleştirildi. Tüm reaktifler ve malzemeler uygun yerlere yerleştirildi. İzolasyon işleminden sonra 1. sıradaki elüsyon tüplerinde 60 µl'lik RNA izolatu elde edildi. İzole edilen total RNA'lar cDNA sentezlenmek üzere -80°C saklandı.

miRNA için cDNA SENTEZİ

İzole edilen total RNA'lardan, cDNA sentezi her iki grup için Sugenic Biotechnology SuScript cDNA Synthesis Kit (Sugenic, Türkiye) ile Stem Loop (ST) primer kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi. Optimize reaksiyon buffer, MgCl₂ oligo- dTs, random heksamer, reverse transkriptaz içeren 5X RTMix, miRNA'ya spesifik ST primer, total RNA ve DNase/RNase içermeyen su ile karıştırıldı. Hazırlanan karışımın miktarları Tablo 5'te, miRNA'ya spesifik ST primer dizileri tablo 6'da verilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra cDNA sentezi için 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Sentezlenen cDNA'lar RT-PZR yapılmak üzere -20°C'de saklandı.

Tablo 5. cDNA sentez karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
5X RT Mix	5 µl
Total RNA	4 µl
ST Primer	1 µl
DNase/RNase içermeyen su	15 µl
Total Hacim	25 µl

Tablo 6. cDNA sentezinde kullanılan ST primer dizileri

Gen	Stem Loop Primer Dizileri
U6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAAAT ATGG
miRNA -122	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCAAACA
miRNA -155	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCCCCTA TCACG
miRNA -224	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCTGTTC
miRNA -21	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCAACA

miRNA için GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Bu çalışmada 72 tüp okuyabilen Rotor-Gene Q 5plex (Qiagene, Almanya) cihazı ve 2X SuBRYGreen qPCR Mastermix (Sugenomics, Türkiye) kiti kullanılmış olup amplifikasyon ürünlerinin artışı anlık olarak takip edilebilmektedir. Reaksiyon tüpleri dizildikten sonra her örnek ve her gen için ayrı ayrı tüplere HotStart Taq DNA polimeraz, dUTP/dTTP, ROX boyası içeren 2X SuBRYGreen qPCR Mastermix, gene spesifik forward ve reverse primerler, cDNA örneği ve DNase/RNase içermeyen su konuldu. Tüpler cihaza dizildi ve üretici firmanın önerdiği protokole göre cihaz ayarlanarak reaksiyon başlatıldı. RT-PZR ile kontrol ve HCV+ hasta gruplarında U6, miRNA-122, miRNA-155, miRNA-224, miRNA-21 gen ifadelerinin nasıl değiştiği belirlendi. Her tüpteki reaksiyon bileşimi Tablo 7’de, reaksiyonda kullanılan primer dizileri Tablo 8’de, reaksiyon aşamaları tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 7. miRNA için RT-PZR bileşimi

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
2X SuBryGreen qPCR Mastermix	10 µl
Forward primer	0,5 µl
Reverse primer	0,5 µl
Sample DNA	2 µl
DNase/RNase içermeyen su	7 µl
Total Hacim	20 µl

Tablo 8. miRNA saptanması için RT-PZR'de kullanılan primer dizileri

Gen	Primer Dizileri
U6	F: GCGGCGGCGCAAGGATGACACG R: ACGCTTACGAATTTGCGTGT
MiRNA-122	F: AACCGGTGGAGTGTGACAAT R: GTCGTATCCAGTGCAGGGT
MiRNA-155	F: GCGGCGGTTAATGCTAATCGTG R: ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
MiRNA-224	F: AGCGGTGGCTCAGTTCAGCA R: GTGCAGGGTCCGAGGT
MiRNA-21	F: GCCCGCTAGCTTATCAGACTGATG R: CAGTGCAGGGTCCGAGGT

Tablo 9. miRNA için RT-PZR protokolü

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Siklus Sayısı
HotStart Aktivasyon	95°C	300 saniye	1
Amplifikasyon	95°C	10 saniye	40
	60°C	15 saniye	40
	72°C	20 saniye	40

Deneyde, SYBR Green metodu kullanıldı. DNA primerlerinin bağlanması ile az sayıdaki SYBR Green boya molekülleri çift sarmal DNA'ya bağlanır. Bağlanan SYBR Green boya moleküllerinin ışık ile uyarılması ile etkili şekilde ışık saçımının artmasına neden olur. Uzama aşamasında daha fazla çift sarmal DNA oluştuğunda, daha fazla boya molekülü bağlanır ve ışık saçımını artırır. Her siklus sonunda ışımadaki artış verisi toplanarak anlık olarak bilgisayar ekranından izlenir.

Referans genler yardımıyla hedef genlerdeki rölatif değışiklikler analiz edildi. RT-PZR ile elde edilen amplikonların, logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısı yazılım tarafından belirlendi ve ct değeri olarak belirlendi. İlk olarak, örneklerdeki hedef (T) gen kopyalarının ct değeri ile housekeeping (H)gen kopyalarının ct değerlerinden farkı (T-H) alınarak Δct değeri hesaplandı. İkinci basamakta kontrol grubunun Δct değerlerinin ortalaması alındı. Daha sonra örneklerin Δct değerlerinden bu ortalama çıkarılarak $\Delta\Delta ct$ değeri hesaplandı. $2^{-\Delta\Delta ct}$ formülü hesaplandı. Her iki grup için de ortalama gen ifadesi olarak hesapladıktan sonra gruplar arasındaki rölatif değışimler bulundu (106).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

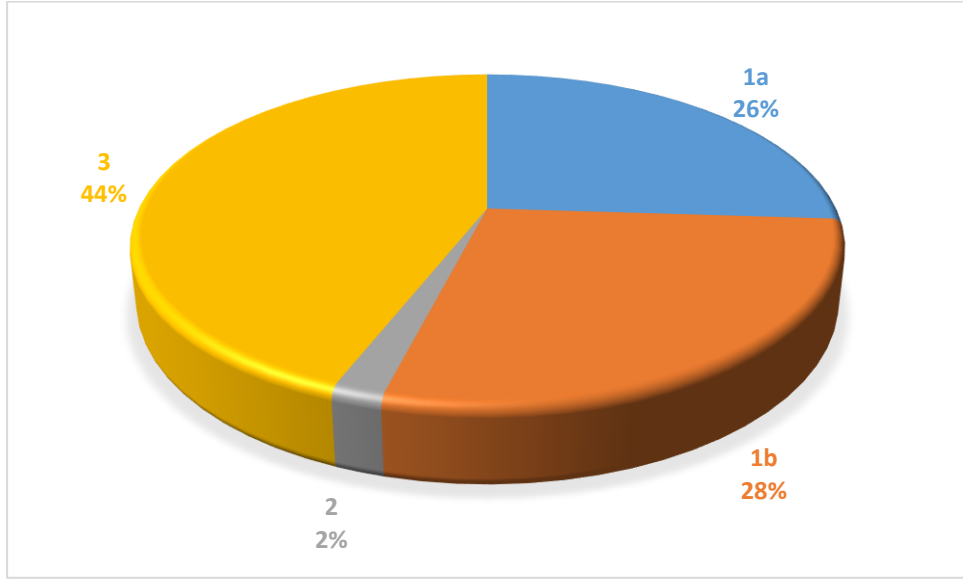
Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, ortanca, çeyrekler arası aralık (ÇAA) ve en küçük-en büyük değerler ile kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk ve Kolmogorov Smirnov testleri ile incelenmiştir. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi ve Kruskal Wallis varyans analizi kullanılmıştır. Ayrıca kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ki-kare analizi ve sayısal değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde Spearman korelasyon analizi kullanılmıştır. Bağımlı değişken olan HCV enfeksiyon varlığı üzerinde etkili olan risk faktörlerinin belirlenmesinde ise tek değişkenli ve çok değişkenli lojistik regresyon analizi kullanılmıştır. Ayrıca incelenen miRNA'ların HCV enfeksiyonunu ayırt ediciliklerinin belirlenmesi için Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi yöntemi kullanılmıştır. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına 22.06.2022/10.01.2023 tarihleri arasında HCV RNA istemi ile gelen kan örneklerinden HCV RNA pozitif çıkan, 18-60 yaş arası, başka sistemik ya da karaciğer hastalığı olmayan 50 hasta çalışmaya dahil edildi. Kronik hastalığı olmadığı bilinen 18-60 yaş arası 50 gönüllü kontrol grubu olarak seçildi.

HCV GENOTİPLERİNİN DAĞILIMI

HCV RNA pozitif çıkan 50 hastanın plazma örneklerinden genotip çalışması yapıldı. 13 hastanın (%26) genotip 1a, 14 hastanın (%28) genotip 1b, 1 hastanın (%2) genotip 2, 22 hastanın (%44) genotip 3 olduğu tespit edildi (Şekil 4).



Şekil 4. HCV genotiplerinin dağılımı

HASTALARIN GENOTİPLERİNE GÖRE CİNSİYET YAŞ ve LABORATUVAR BULGULARI

Genotip 2 ile enfekte bir hasta olduğu için genotipler arası karşılaştırmalarda değerlendirme dışı bırakılmıştır. Farklı HCV genotipleri ile enfekte hastaların

cinsiyetleri karşılaştırıldı (Tablo 10). Genotip 1a ile enfekte olan hastaların 2'sinin (%15,4) kadın, 11'inin (%84,6) erkek; genotip 1b ile enfekte hastaların 10'unun (%71,4) kadın, 4'ünün (%28,6) erkek; genotip 3 ile enfekte hastaların 4'ünün (%18,2) kadın, 18'inin (%81,8) erkek olduğu tespit edildi (p=0,001). Genotip 1a ve 3 ile enfekte olan hastalarda erkeklerin anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü.

Tablo 10. Genotip gruplarına göre cinsiyet verilerinin karşılaştırılması

Cinsiyet	1a		1b		3		p
	n	Yüzde	n	Yüzde	n	Yüzde	
Kadın	2	%15,4	10	%71,4	4	%18,2	0,001*
Erkek	11	%84,6	4	%28,6	18	%81,8	

*p: <0,05

Farklı HCV genotipleriyle enfekte hastaların yaş ve laboratuvar bulguları karşılaştırıldı (Tablo 11). Genotip 1b ile enfekte hastaların genotip 1a ve 3 ile enfekte hastalardan anlamlı şekilde daha ileri yaşta olduğu görüldü (p=0,004). Her 3 genotip arasında AST, ALT, ALP ve HCV RNA değerleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

Tablo 11. Genotip gruplarına göre yaş ve laboratuvar verilerinin karşılaştırılması

Laboratuvar Parametreleri	1a	1b	3	p
	AO±SS Ortanca (ÇAA 1. ve 3. Çeyrek)	AO±SS Ortanca (ÇAA1. ve 3. Çeyrek)	AO±SS Ortanca (ÇAA 1. ve 3. Çeyrek)	
Yaş	26,38 ± 3,31 26 (24 - 28,5)	43,86 ± 13,39 45 (35 - 55,5)	28,23 ± 8,63 26,5 (23,75 - 29)	0,004*
AST (IU/L)	30,23 ± 14,36 28 (19 - 38,5)	59,79 ± 108,64 29,5 (21,5 - 37,25)	32,5 ± 28,17 27 (19,75 - 32,25)	0,801
ALT (IU/L)	54,62 ± 42,46 55 (22,5 - 67,5)	63,29 ± 121,16 35 (22,5 - 38,5)	54,32 ± 67,34 40,5 (19,5 - 53,75)	0,416
ALP (IU/L)	84,92 ± 17,57 91 (63,5 - 99,5)	88,93 ± 121,16 81,5 (68,75 - 117)	81,5 ± 22,45 79 (65,5 - 100)	0,636
HCV RNA (IU/L)	1403976,15 ± 2591750,16 402000 (99650 - 1770000)	2133264,29 ± 3163107,77 2133264,29 (24775 - 3245000)	1492236,95 ± 2888182,14 321000 (12627,5 - 1190000)	0,721

*p: <0,05; AO: Aritmetik ortalama; SS: Standart sapma; ÇAA: Çeyrekler arası aralık; AST: Aspartat amino transferaz; ALT: Alanin amino transferaz; ALP: Alkalen fosfat; HCV: Hepatit C virüsü; RNA: Ribonükleik asit; IU: Uluslararası birim; L: Litre

KONTROL ve HASTA GRUPLARININ DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ

Kontrol grubunun 28'i (%56) kadın, 22'si (%44) erkek, hastaların ise 16'sı (%32) kadın, 34'ü (%68) erkekti (p=0,016) (Tablo 12). Hasta ve kontrol grubunda cinsiyet dağılımı anlamlı farklılık göstermektedir. Hasta grubunda erkek sayısının anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü.

Tablo 12. Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet yüzdeleri

Cinsiyet	Kontrol		Hasta		p değeri
	n	Yüzde	n	Yüzde	
Kadın	28	%56	16	%32	0,016*
Erkek	22	%44	34	%68	

*p: <0,05

Kontrol grubunun yaş ortalaması $36,42 \pm 9,22$ iken hasta grubunun yaş ortalaması $32,18 \pm 11,71$ olarak bulundu. Bu bulgulara göre hasta grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha gençti (p=0,005).

KONTROL ve HASTA GRUPLARININ LABORATUVAR BULGULARI

Hasta ve kontrol gruplarının laboratuvar bulguları karşılaştırıldı (Tablo 13). Kontrol grubunun AST değerinin ortalaması $14,94 \pm 5,27$ IU/L iken hasta grubunda AST değerinin ortalaması $39,48 \pm 60,72$ IU/L olarak bulundu. Kontrol grubunun ALT değerlerinin ortalaması $18,42 \pm 9,55$ IU/L, hasta grubunda $56,76 \pm 79,38$ IU/L olarak bulundu. Kontrol grubunun ALP değerlerinin ortalaması $65,4 \pm 29,46$ IU/L, hasta grubunda $84,44 \pm 22,3$ IU/L olarak bulundu. Hasta grubunun AST, ALT ve ALP değerlerinin, kontrol grubundakilere göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi (p<0,0001). Hasta grubunun HCV RNA değerlerinin ortalaması $1622592,06 \pm 2830469,7$ IU/L olarak bulundu.

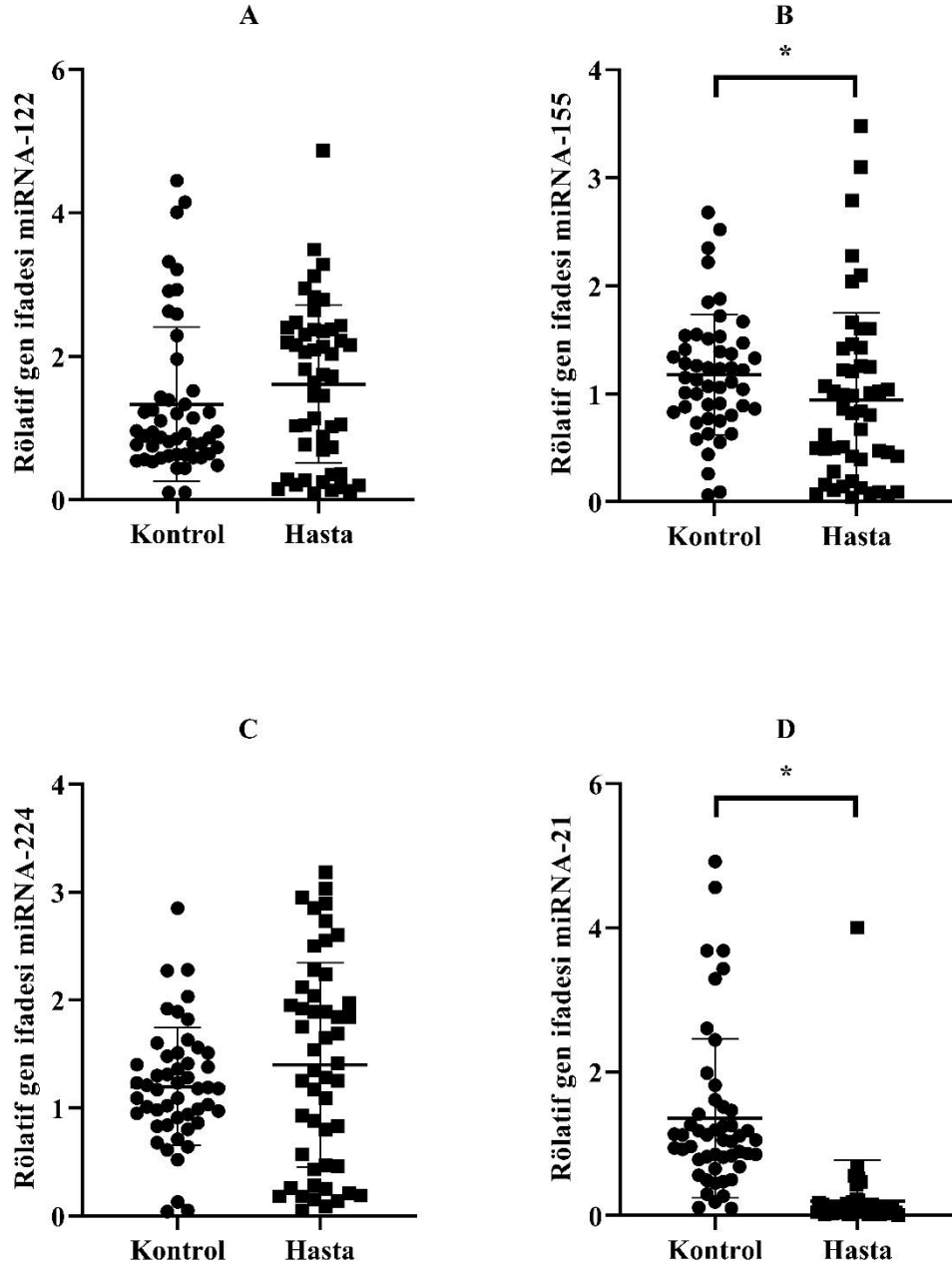
Tablo 13. Kontrol ve hasta gruplarının laboratuvar sonuçları

Laboratuvar Parametreleri	Kontrol		Hasta		p değeri
	AO ± SS	Ortanca (ÇAA 1. – 3. Çeyrek)	AO ± SS	Ortanca (ÇAA 1. – 3. Çeyrek)	
AST (IU/L)	14,94 ± 5,27	15 (11,5 - 19)	39,48 ± 60,72	28 (19,75 - 35,25)	<0,0001*
ALT (IU/L)	18,42 ± 9,55	16 (10,75 - 23,25)	56,66 ± 79,38	37 (22,75 - 55,5)	<0,0001*
ALP (IU/L)	65,4 ± 29,46	60 (50,25 - 75,75)	84,44 ± 22,3	81 (65,75 - 101)	<0,0001*
HCV RNA (IU/L)	-	-	1622592,06 ± 2830469,7	370000 (32400 - 1765000)	-

*p: <0,05; AO: Aritmetik ortalama; SS: Standart sapma; ÇAA: Çeyrekler arası aralık; AST: Aspartat amino transferaz; ALT: Alanin amino transferaz; ALP: Alkalen fosfataz; HCV: Hepatit C virüs; RNA: Ribonükleik asit; IU: Uluslararası birim; L: Litre

miRNA EKSPRESYONLARININ KONTROL ve HASTA GRUPLARI ARASINDAKİ DEĞİŞİMİ

Hasta grubunun miRNA-122, miRNA-155, miRNA-21, miRNA224 ekspresyonları RT-PZR yapılarak plazmada ölçüldü ve kontrol grubunun ile karşılaştırıldı (Tablo 14, Şekil 4). Buna göre miRNA-122 ve miRNA-224 ekspresyonları açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmazken, miRNA-155 (p00,014), miRNA-21 (p<0,0001) ekspresyonlarının hasta grubunda anlamlı şekilde azaldığı görüldü.



Şekil 5. Hasta ve kontrol gruplarının miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması A) miRNA-122; B) miRNA-155; C)miRNA-224; D)miRNA-21

Tablo 14. Kontrol ve hasta grupları miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması

miRNA	Kontrol	Hasta	p
	AO±SS Ortanca (Ç.A.A.1. ve 3. Çeyrek)	AO±SS Ortanca (Ç.A.A.1. ve 3. Çeyrek)	
miRNA-122	1,33 ± 1,07 0,91 (0,63 – 1,45)	1,61 ± 1,1 1,73 (0,61 – 2,37)	0,18
miRNA-155	1,18 ± 0,56 1,14 (0,82 – 1,48)	0,94 ± 0,81 0,83 (0,36 - 1,3)	0,01*
miRNA-224	1,2 ± 0,54 1,18 (0,9 – 1,49)	1,4± 0,95 1,38 (0,45 – 2,06)	0,26
miRNA-21	1,35 ± 1,11 1,05 (0,76 – 1,47)	0,21 ± 0,57 0,08 (0,04 – 0,16)	0,0001*

*p: <0,05; AO: Aritmetik ortalama; SS: Standart sapma; ÇAA: Çeyrekler arası aralık;

HASTA GRUBUNDA MiRNA EKSPRESYONLARI ile LABORATUVAR BULGULARI ARASINDAKİ İLİŞKİ

Hasta grubunun miRNA-122, miRNA-155, miRNA-21, miRNA-224 ekspresyon seviyeleri ile yaş, AST, ALT, ALP, HCV RNA ve dört miRNA ekspresyon seviyelerinin birbirleri arasındaki ilişki incelendi. miRNA-122, miRNA-155, miRNA-21, miRNA-224'nın ekspresyon seviyesi ile yaş, ALT, AST, ALP, HCV RNA seviyeleri arasında anlamlı korelasyon olmadığı görüldü (Tablo15). Bunun yanında dört miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin birbirleri arasında pozitif yönlü korelasyon olduğu bulundu.

Tablo 15. Hasta grubu miRNA ekspresyonları ile diğer bulgular arasındaki ilişki

Parametreler		miRNA-122	miRNA-155	miRNA-224	miRNA-21
Yaş	r	,172	,072	,131	-,169
	p	,232	,618	,366	,240
AST	r	,032	,119	-,006	,184
	p	,823	,411	,969	,200
ALT	r	,025	,188	,002	,197
	p	,864	,191	,988	,170
ALP	r	-,006	-,103	-,140	,010
	p	,969	,477	,331	,947
HCVRNA	r	,122	,098	-,136	,058
	p	,398	,496	,346	,689
miRNA-122	r	-	,768**	,770**	,403**
	p		,000	,000	,004
miRNA-155	r	-	-	,794**	,494**
	p	-		,000	,000
miRNA-224	r	-	-	-	,569**
	p	-	-		,000
miRNA-21	r	-	-	-	-
	p	-	-	-	

*p: <0,05; r: Spearman korelasyon katsayısı; AST: Aspartat amino transferaz; ALT: Alanin amino transferaz; ALP: Alkalen fosfataz; HCV: Hepatit C virüsü; RNA: Ribonükleik asit; IU: Uluslararası birim; L: Litre

PARAMETRELERİN LOJİSTİK REGRESYON ANALİZİ ile İNCELENMESİ

Cinsiyet, yaş, ALT, AST, ALP, miRNA-122, miRNA-155, miRNA-224, miRNA-21 parametrelerinin HCV enfeksiyonu ile ilişkili olup olmadığını anlamak için tek değişkenli lojistik regresyon analizi yapıldı (Tablo 16). Cinsiyet, yaş, ALT, AST, ALP, miRNA-21 parametrelerinin anlamlı şekilde HCV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu ve HCV enfeksiyonunu tahmin edebileceği görüldü.

Tablo 16. Tek değişkenli lojistik regresyon analizi

Parametreler	P	OR	%95 GA Alt	%95 GA Üst
Cinsiyet	0,017*	2,705	1,197	6,113
Yaş	0,05*	0,962	0,926	1,000
AST	0.0001*	1,266	1,148	1,396
ALT	0.0001*	1,098	1,054	1,143
ALP	0,001*	1,037	1,015	1,060
miRNA-122	0,205	1,271	0,877	1,843
miRNA-155	0,099	0,606	0,334	1,099
miRNA-224	0,191	1,415	0,841	2,381
miRNA-21	0.0001*	0,024	0,006	0,103

*p: <0,05; OR: Odd's oranı; GA: Güven aralığı; AST: Aspartat amino transferaz; ALT: Alanin amino transferaz; ALP: Alkalen fosfataz

İlişkili parametrelerin bağımsız etkilerinin değerlendirilmesi için tek değişkenli inceleme sonucunda istatistiksel olarak anlamlı etkisi olan değişkenler kullanılarak çok değişkenli lojistik regresyon analizi yapıldı (Tablo 17). AST (O.D.:1,263) ve miRNA-21 (O.D.:0,0039) parametreleri HCV enfeksiyonu ile ilişkili bulundu. Artan AST veya azalan miRNA 21 seviyeleri HCV enfeksiyonu için tanımlayıcı potansiyele sahiptir.

Tablo 17. Çok değişkenli lojistik regresyon analizi

Parametreler	P	OR	%95 GA Alt	%95 GA Üst
Cinsiyet	0,646	1,497	0,267	8,390
Yaş	0,197	0,956	0,894	1,023
AST	0,012*	1,263	1,052	1,517
ALT	0,966	0,998	0,913	1,091
ALP	0,187	1,015	0,993	1,038
miRNA-21	0.0001*	0,039	0,007	0,222

*p: <0,05; OR: Odd's oranı; GA: Güven aralığı; AST: Aspartat amino transferaz; ALT: Alanin amino transferaz; ALP: Alkalen fosfataz

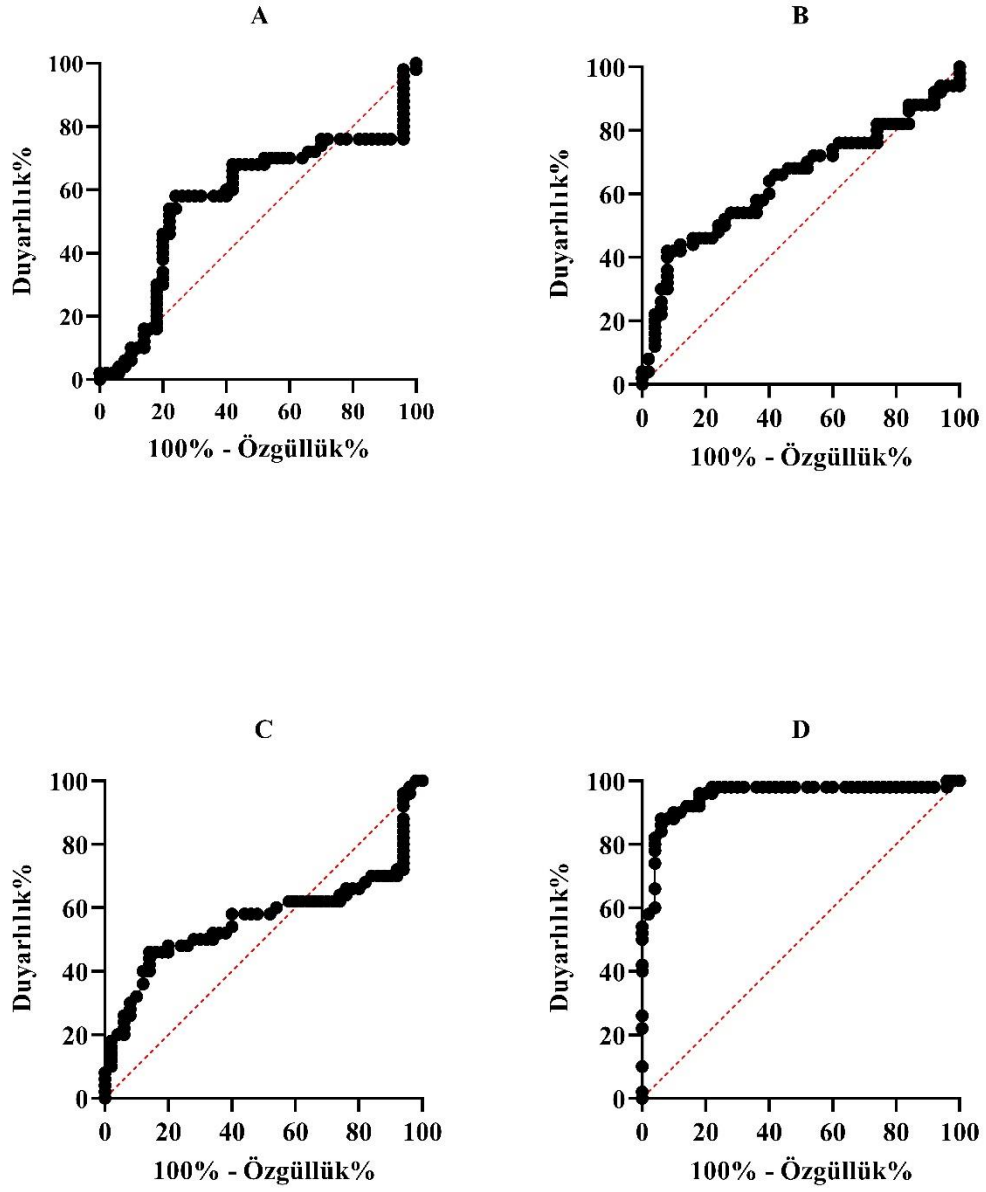
ROC ANALİZİ

Analiz edilen miRNAların HCV enfeksiyonu için tanı koydurucu olup olmadıklarını anlamak için ROC analizi yapıldı (Şekil 6). ROC analizinde miRNA-122 için eğri altı alan (EAA) 0,576 (p=0,06), miRNA-155 için EAA 0,643 (p=0,014), miRNA-224 için EAA 0,564 (p=0,269), miRNA-21 için EAA 0,951 (p<0,001) olarak hesaplandı (Tablo 18, Şekil 6). miRNA-155 ve miRNA-21'in istatistiksel olarak anlamlı şekilde hasta ve sağlıklı kişiler üzerinde ayırt edici olduğu görüldü. MiRNA-155 %64,3 oranında hasta ve sağlıklı kişileri ayırt edebiliyorken; miRNA-21 %95,1 oranında hasta ve enfekte kişileri ayırt etti.

Tablo 18. ROC analizi

miRNA	EAA	Std Hata	p	%95 GA Alt	%95 GA Üst
miRNA-122	0,576	0,06	0,188	0,458	0,694
miRNA-155	0,643	0,056	0,014*	0,532	0,754
miRNA-224	0,564	0,061	0,269	0,445	0,684
miRNA-21	0,951	0,023	0,0001*	0,906	0,997

*p: <0,05; Std: Standart; EAA: Eğri altı alan; GA: Güven aralığı

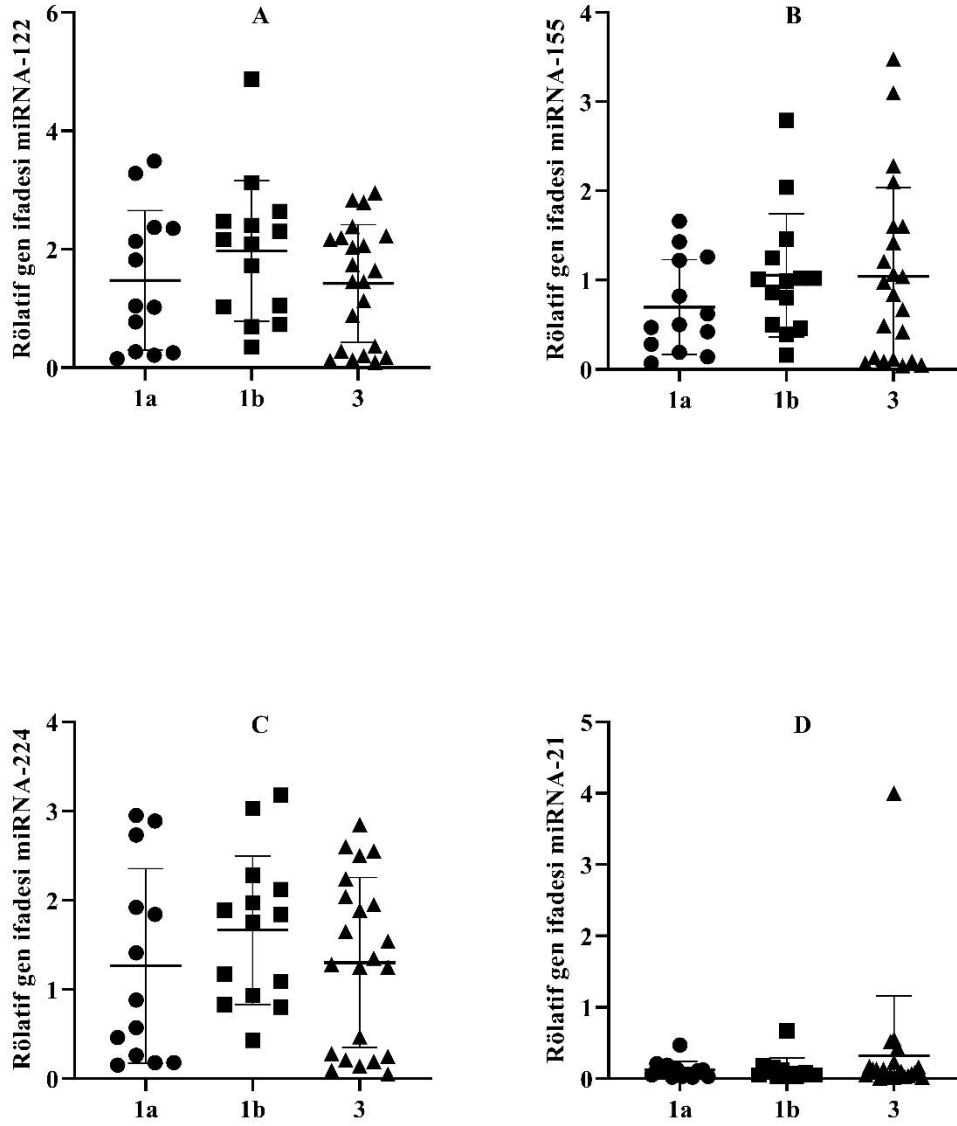


Şekil 6. miRNA ekspresyon seviyelerinin ROC analiz eğrileri A)miRNA-122; B) miRNA-155; C)miRNA-224; D)miRNA-21

HASTALARIN GENOTİPLERİNE GÖRE MiRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİ

Bu üç HCV genotipi ile enfekte hastaların miRNA ekspresyonları arasında fark olup olmadığını belirlemek için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri karşılaştırıldı (Şekil 7, Tablo 19). Her

üç genotip arasında miRNA-122, miRNA-155, miRNA-224 ve miRNA-21 ekspresyon seviyeleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 19).



Şekil 7. Genotip gruplarının miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması A) miRNA-122; B) miRNA-155; C)miRNA-224; D)miRNA-21

Tablo 19. Genotip gruplarına göre miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması

miRNA	1a	1b	3	p
	AO±SS Ortanca (ÇAA 1. ve 3. Çeyrek)	AO±SS Ortanca (ÇAA 1. ve 3. Çeyrek)	AO±SS Ortanca (ÇAA 1. ve 3. Çeyrek)	
miRNA-122	1,47 ± 1,18 1,04 (0,26 – 2,36)	1,97 ± 1,19 2,12 (0,96 – 2,51)	1,42 ± 1 1,55 (0,26 – 2,2)	0,32
miRNA-155	0,7 ± 0,53 0,7 (0,24 – 1,24)	1,05 ± 0,69 1,80 (0,49 - 1,3)	1,04 ± 1 0,91 (0,11 – 1,6)	0,54
miRNA-224	1,26 ± 1,09 0,88 (0,22 – 2,32)	1,67 ± 0,83 1,8 (0,91 – 2,16)	1,3 ± 0,95 1,32 (0,24 -2,09)	0,44
miRNA-21	0,12 ± ,012 0,11 (0,03 – 0,16)	0,12 ± 0,16 0,7 (0,05 – 0,13)	0,32 ±,084 0,1 (0,04 – 0,18)	0,89

*p: <0,05; AO: Aritmetik ortalama; SS: Standart sapma; ÇAA: Çeyrekler arası aralık

TARTIŞMA

HCV enfeksiyonu tüm dünyada kronik karaciğer hastalıklarının ana nedenlerinden biridir (107). Dünya çapında her yıl yaklaşık 1 milyon kişinin HCV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. HCV ile enfekte hastaların %85'e varan kısmı virüs klirensi sağlayamamakta ve kronik enfeksiyon geliştirmektedir. Kronik enfeksiyon sonucu hastalarda karaciğer fibrozu, siroz, ekstrahepatik tutulum ve HSK gelişebilmektedir (2). HCV enfeksiyonu prevalansı farklı coğrafik bölge ve ülkelere göre değişiklik gösterir. Bunun nedeni toplumların risk faktörlerinin farklılığı ve epidemiyolojik özellikleridir (108). Bu faktörlere bağlı olarak HCV genotiplerinin dünya üzerinde dağılımları coğrafi bölge ve ülkelere göre değişmektedir. Genotip 1 tüm dünyada en yaygın genotip iken ve bunu genotip 3, genotip 2 ve genotip 4 takip etmektedir. Bunlar içinde tek başına subtip 1b'nin en yaygın subtip olduğu ve tüm enfeksiyonların %22'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (4). Düşük gelirli ülkelerde genotip 4, orta gelirli ülkelerde genotip 3, yüksek ve orta gelirli ülkelerde genotip 1 baskındır (109). Genotip 1 Amerika ve Avrupa kıtalarında Çin ve Japonya'da en sık görülen genotiptir. Genotip 2 Orta Afrika'da en yüksek yaygınlığı gösterirken, genotip 3 Hindistan bölgesinde ve Kuzey Avrupa'daki en sık genotiptir. Genotip 4 Orta Doğu'da, genotip 5 Güney Afrika'daki enfeksiyonların çoğundan sorumludur. Genotip 6 Doğu ve Güney Doğu Asya'da en yüksek frekanslarda bulunurken Laos ve Vietnam'da baskın genotiptir. Genotip 7 Orta Afrika'da birkaç vakada görülmüştür. Genotip 8 ise Hindistan'da birkaç vakada tespit edilmiştir (110). Avrupa'daki genotip dağılımını inceleyen bir çalışmada genotip 1'in en sık genotip olduğu ve bunu değişen oranlarda genotip 3, 4, 2, mikst tip genotiplerin takip ettiği gösterilmiştir (111). Türkiye'de yapılan çalışmalarda HCV genotipleri içinde genotip 1b %66.7 - 100 arasında olup birinci sıklıkla görülmektedir (5). HCV genotiplerinin tespit edilmesi; aşı geliştirme çalışmaları, epidemiyolojik verilerin toplanması, prognozun belirlenmesi ve uygulanacak tedavinin belirlenmesinde önemlidir (112).

Bizim çalışmamızda HCV RNA pozitif çıkan 50 hastanın 13'ü (%26) genotip 1a, 14'ü (%28) genotip 1b, 1'i (%2) genotip 2, 22'si (%44) genotip 3 ile enfekte olduğu tespit edildi (Bkz. Şekil 4). Ülkemizde farklı çalışma gruplarının 2013, 2015 ve 2020 yıllarında yaptıkları çalışmalarda genotip 1b sıklığı %68'in üzerinde iken genotip 3 sıklığı yıllara göre sırasıyla %2, %4,9 ve %11,6 çıkmıştır (10, 112, 113). Bu çalışmalar

bizim çalışmamızın aksine Türkiye’de genotip 1b’nin en yaygın olduğunu ve genotip 3 ‘ün görülme sıklığının az olduğunu göstermiştir.

2022 yılında Mersin’de Bozok ve Çelik’in çalışmasında, hastaların genotiplerini ve uyruklarını incelenmiştir. Hastaların %32,1’i genotip 1b, %26,2 genotip 1a, %20,3’ünde genotip 3, %11,9’unda genotip 4, %5,4’ünde genotip 2 ve %1’inde genotip 5, %3’ünde mixt genotip olduğu saptanmıştır (114). Çalışkan ve ark. yaptığı çalışmada, HCV RNA pozitif 313 hastanın 51,7’si genotip 1, 46’sı genotip 3 olarak bulunmuştur (115). Bu çalışmalar ülkemizdeki genotip 3 yaygınlığının azımsanamayacağını ve nüfus hareketlerinin bir bölgedeki etken HCV genotiplerinin dağılımını etkileyebileceğini göstermiştir.

Bursa’da Ağca ve ark. yaptığı çalışmada, 2016 ile 2020 yılları arasında takip edilen hastaların genotiplerini incelenmiş, genotip 1b’nin yaygınlığının geçen yıllarla azalırken, genotip 1a ve 3’ün yaygınlığının anlamlı şekilde arttığını ortaya koymuştur (116). Antalya’da 2014 ve 2021 yıllarında yapılan iki çalışmada genotip 1b’nin sıklığı %78’den %74’e düşerken, genotip 3 sıklığı ise %11’den %18’e çıktığı gösterilmiştir (117, 118). Kayman ve ark. Kayseri’de yaptıkları çalışma genotip 1b %62,4 ile en yaygın genotip olurken, %32 ile genotip 4 takip etmiştir (119). Bu çalışmalar göstermiştir ki kitlesel göç hareketleri, turistik seyahatler, dış ülkelere giden yurttaşlarımız genotip 1b dışındaki genotiplerin ülkemize gelmesine sebep olmuştur.

Ayrıca damar içi madde kullananlar arasında, 2016 yılında Çukurova bölgesinde ve 2018 yılında İstanbul’da yapılan iki ayrı çalışmada HCV ile enfekte hastalardaki genotip 3 oranı sırasıyla %58,6 ve %33,3 olarak tespit edilmiştir (120, 121). Farklı ülkelerdeki çalışmalarda da damar içi madde kullanımı olanlarda genotip 3’ün arttığı gösterilmiştir (122). Örneğin Hindistan’da damar içi madde kullanımı olan kişiler arasında yapılan çalışmada hastaların %39,0’ında 3a alt tipi, ardından vakaların %26,9’unda 1a alt tipi ve %20,68’inde 3b alt tipi bulunmuştur (123). Yine Çin’de yapılan bir çalışmada 3b alttipi damar içi madde kullananlarda %20,9 oranında bulunurken enfekte kan bağışçılarında %3,6 oranında bulunmuştur (124). Bizim çalışmamızda da 1a ve 3 Türkiye genotip dağılımına göre yüksek bulunmuştur. Bu durum, toplanan hasta örneklerinin damar içi madde kullanımı olan hasta popülasyonundan oluştuğundan kaynaklanıyor olabilir.

HCV genotiplerinin dağılımının hasta yaşıyla ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Antalya, Van ve Kahramanmaraş'ta yapılan çalışmalarda genotip 1 ile enfekte hastaların yaş ortalaması genotip 3 ile enfekte hastaların yaş ortalamasından anlamlı şekilde fazla bulunmuştur (115, 117, 125). Bozok ve ark. yaptığı çalışmada genotip 1b ile enfekte hastaların yaş ortalaması genotip 1a ve 3 ile yaş ortalamasından yüksek bulunmuştur (114). Bizim çalışmamızda genotip 1b ile enfekte hastaların yaş ortalaması $43,86 \pm 33,39$ çıkarken, 1a ile enfekte hastaların yaş ortalaması $26,38 \pm 3,31$ ve genotip 3 ile enfekte hastaların yaş ortalaması $28,23 \pm 8,63$ çıkmıştır (Bkz. Tablo 11). Litaratür ile uyumlu şekilde genotip 1b ile enfekte hastaların yaş ortalaması anlamlı şekilde genotip 1a ve 3 ile enfekte hastaların yaş ortalamasından yüksektir.

Benzer şekilde HCV genotiplerinin dağılımının hasta cinsiyeti ile de ilişki olduğu çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Selek ve ark. yaptığı çalışmada, genotip 1a ve 3'ün erkeklerde, genotip 1b'nin ise kadınlarda daha fazla saptandığı bulunmuş ancak bu çalışmada, yaş ortalamaları açısından genotipler arası anlamlı fark bulunamamıştır (126). Mersin'de Bozok ve Çelik'in yaptığı çalışmada ise genotip 1a ve 3 erkeklerde, genotip 1b ise kadınlarda anlamlı oranda daha fazla saptanmıştır (114). Adana'da Öztürk ve ark. yaptığı çalışmada genotip 1b ile anlamlı şekilde kadınlarda daha sık iken genotip 3 erkeklerde daha siktir (127). Batı Avrupa, Rusya ve İsrail'de yapılan bir çalışmada genotip 1b ve 2'nin kadınlarda; genotip 1a, 3 ve 4'ün ise erkeklerde daha yaygın olduğu gösterilmiştir (128). Bu duruma sebep olarak erkeklerin yüksek riskli cinsel ilişki ve uyuşturucu kullanıma daha yatkın olması iken kadınların risk olarak kan transfüzyonuna daha yatkın olması gösterilebilir (111, 129). Bizim çalışmamızda genotip 1a ile enfekte hastaların %15,4'ü kadın %84,6'sı erkek; genotip 1b ile enfekte hastaların %71,4'ü kadın %28,6'sı erkek; genotip 3 ile enfekte hastaların %18,2'si kadın %81,8 erkek olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 10). Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak genotip 1a ve 3 ile enfekte hastalarda anlamlı şekilde erkeklerde fazla iken grup 1b için anlamlı olmasa da belirgin şekilde kadınlarda daha sık saptanmıştır.

HCV ile enfekte kan donörleri ve damar içi madde kullananlar arasında yapılan bir çalışmada erkek/kadın oranı damar içi madde kullananlarda anlamlı şekilde daha yüksek bulunurken, kan donörleri önemli ölçüde daha genç bulunmuştur (124). Antalya'da yapılan bir çalışmada Genotip 1a ve 3a damar içi madde kullananlarda

anlamli olarak daha sikk olduğu görülürken, genotip 1b damar içi madde kullanımı olmayan hastalarda anlamli Şekilde daha sikk olduğu bulunmuştur (118). Bunun yanında genotip 1a ve 3a ile enfekte hastaların anlamli Şekilde genç erkeklerde yaygın iken genotip 1b orta yaşlı kadınlarda daha anlamli Şekilde daha yaygın olduğu görülmüştür. Bu bulgular bizim çalıŐmamızdaki hasta grubunun yoğunlukla damar içi madde kullanan hastalardan oluŐtuđunu düŐünmektedir.

Çalışmamızda farklı HCV genotipleriyle enfekte hastaların laboratuvar bulgularını karşılaştırdık (Bkz. Tablo 11). Genotip 2 ile enfekte bir hasta olduğu için değerlendirme dışı bırakılmıştır. Her 3 genotip arasında AST, ALT, ALP ve HCV RNA değerleri açısından anlamli fark bulunamamıştır.

Kronik hepatit hastalarında HCV genotipleri ile viral yükler arasındaki ilişkiyi belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Daha yüksek HCV RNA düzeyleri daha belirgin klinik belirtilerle ve daha ciddi karaciğer hasarına neden olduğu bilinmektedir. HCV genotipi/alt tipinin tedavi sırasında viral yük değerimleri ile birlikte tedavi stratejilerini belirlemek ve nüks oranlarını tahmin etmek için çok önemli olduğu iyi bilinmektedir (130). Ancak, genotip ile viral yük arasındaki ilişki hakkında birçok tutarsız sonuç bildirilmiştir. YurtdıŐında yapılan birçok çalışmada genotip 1 ile enfekte olan hastaların HCV RNA seviyesinin diğer genotiplerle enfekte olan hastaların HCV RNA seviyelerinden daha yüksek bulunmuştur (130, 131). Bu çalışmalara benzer olarak başka bir çalışmada genotip 1 ve 6 enfekte hastalardaki HCV RNA seviyeleri genotip 2 ve 3 ile enfekte olanlardan anlamli Şekilde daha yüksek bulunmuştur (132). Bu durumun nedeninin genotip 1 ve 6'nın daha verimli replike olması ile ilgili olabileceği öne sürülmüŐtür (131, 132). Pakistan ve Nepal'de yapılan birer çalışmada ise genotip 3 ile enfekte hastaların tedavi öncesi viral yüklerinin diğer genotiplere göre yüksek olduğu gösterilmiştir (133, 134). Ancak Pakistan ve İskoçya'da yapılan çalışmalarda genotip 3'n düşük viral yük ile ilişkili olduğu bulunmuştur (135, 136). Bu çalışmaların aksine İnan'da yapılan iki çalışmada genotip 1a, 1b ve 3 ile enfekte HCV hastalarında viral yük açısından anlamli bir fark bulunamamış (137, 138). Yine Türkiye'de yapılan birçok çalışmada viral yük açısından HCV genotipleri arasında anlamli bir fark bulunamamıştır. Mersin, İnanbul, Nevşehir ve Antalya'da yapılan çalışmalarda genotipler arasında HCV-RNA düzeyleri açısından anlamli bir ilişki saptanmamıŐ (114, 117, 119, 140). KiriŐi ve ark. yaptığı çalışmada viral yük açısından

genotip 1 ve genotip 3 ile enfekte hastalar arasında anlamlı fark bulunamamış (141). Kırdar ve ark. yaptığı çalışmada genotip 1a, 1b ve 3 ile enfekte hastaların HCV RNA seviyeleri arasında anlamlı fark bulunamamış (10). Bu sonuçlar çalışmamızla uyumludur.

Kronik hepatit hastalarında HCV genotipleri ile karaciğer fonksiyon testleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için de birçok çalışma yapılmıştır. HCV'nin hepatotropik bir virüs olmasından kaynaklı karaciğer fonksiyon testlerini bozması beklenen bir durumdur fakat HCV genotipleri arasında fark olup olmadığı çok net değildir. Bunun hakkında yapılan çalışmalarda tutarsız sonuçlar vardır. Hindistanda yapılan bir çalışmada AST düzeylerinin genotip 1'de, genotip 2 ve 3'e göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ancak ALT ve ALP düzeylerinde anlamlı fark bulunamamış (130). Yine Hindistan'da yapılan başka bir çalışmada genotip 1a diğer genotiplere göre anlamlı şekilde daha yüksek ALT ve ALP seviyeleri ile ilişkiliyken, AST seviyeleri arasında anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiş (135). Çin'de yapılan bir çalışmada ise ALT düzeyleri genotip 1'de diğer genotiplere göre anlamlı şekilde yüksekti (131). Kirişçi ve ark. yaptığı çalışmada HCV hastaları arasında genotip 3 olanlarda genotip 1 olanlara göre ALT seviyelerinde anlamlı artış bulunmuş fakat AST seviyelerinde anlamlı fark bulunamamış (141). Kırdar ve ark. yaptığı çalışmada genotipler arası ALT düzeylerinde anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir (10). Yine aynı şekilde Nevşehir ve İstanbul'da yapılan çalışmalarda genotipler arası serum ALT değerlerinde anlamlı bir fark bulunamamış (139, 140). Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak farklı genotiplerle enfekte hastalar arası AST, ALT ve ALP değerlerinde anlamlı bir fark yoktur.

Ayrıca çalışmamızda HCV ile enfekte hastalarla sağlıklı kişilerden seçtiğimiz kontrol grubunun verilerini karşılaştırdık. Kontrol grubunun 28'i (%56) kadın, 22'si (%44) erkek, hastaların ise 16'sı (%32) kadın, 34'ü (%68) erkekti ($p=0,016$) (Bkz. Tablo 12). Hasta grubunda erkek sayısının anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü. Kontrol grubunun yaş ortalaması $36,42 \pm 9,22$ iken hasta grubunun yaş ortalaması $32,18 \pm 11,71$ olarak bulundu. Bu bulgulara göre hasta grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha gençti ($p=0,005$). Yukarıda da tartıştığımız gibi bunun sebebi hasta grubumuzdaki damar içi madde kullanım öyküsü olan genç erkek popülasyonunun yüksek olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

HCV hepatositleri ve karaciğerdeki diğer hücreleri enfekte edip hücrelerin ölümüne sebep olur. Bu nedenle karaciğer fonksiyonları ve karaciğerdeki enzimlerin plazmaya salınımı bozulur. Karaciğerdeki bu bozukluklar pek çok biyokimyasal parametreden takip edilebilir. Bizim çalışmamızda da beklenildiği gibi hasta grubunun AST, ALT ve ALP değerlerinin, kontrol grubununkilere göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0,0001$) (Bkz. Tablo 13). Pakistan’da yapılan bir çalışmada HCV hastaları kronik hepatit, siroz ve HSK olarak ayrılmış ve kontrol grubu ile kıyaslanmış. Çalışmamızla benzer şekilde her üç grupta da AST, ALT ve ALP değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (142). Yine başka bir çalışmada HCV hastaları kronik ve HSK olarak ayrılmış ve iki grupta da AST, ALT ve ALP değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (143). HSK hastalarıyla yapılan bir çalışmada AST ve ALT değerleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (144). Mısır’da genotip 4 ile enfekte hastalarda yapılan çalışmalarda HCV ile enfekte gruplarının ALT, AST, ALP değerleri kontrol grubundakilerden anlamlı şekilde daha fazlaydı (145, 146). Farklı ülkelerde farklı genotiplerle yapılan çalışmalarda da yine HCV ile enfekte hastaların ALT, AST, ALP değerleri kontrol grubundakilerden anlamlı şekilde yüksekti (147, 148). Çalışmamız literatür ile uyumludur.

miRNA’lar, hedef mRNA’ların 3' veya 5'UTR’deki düzenleyici bölgelerine bağlanan 18-25 nükleotidden oluşan kısa, kodlamayan RNA’lardır. MiRNA’nın bağlanması, hedef mRNAların translasyonunu arttırarak ya da durdurarak protein sentezini hızlı ve hassas bir şekilde etkiler(149). miRNA’lar, çok sayıda hücrenel süreci etkileyen karmaşık transkripsiyon sonrası reaksiyonları düzenler (150). miRNA sentezindeki en küçük değişiklik bile birçok proteinin sentezini etkileyebilmesi nedeniyle miRNA sentezini kontrol eden faktörlerin bozulmasının birçok hastalıkta rol oynayabileceği düşünülmüştür (151).

Karaciğer fonksiyon testlerinde kullanılan ALT, AST, ALP gibi biyobelirteçlerin böbrek, kas, kemik vb. dokularda da sentezlenmesi, bu biyobelirteçlerin özgüllüğünü sınırlar ve karmaşık yorumlama gerektirir. Birçok miRNA’nın doku veya organa özgü sentezlenmesi miRNA biyobelirteçlerinin daha yüksek özgüllüğe sahip olma olasılığının arttığını düşündürmektedir (91). HCV ve HBV ile enfekte karaciğer hastalığının farklı evreleriyle ilişkili spesifik miRNA’lar

tanımlanmıştır (98, 99). Karaciğerdeki miRNAların apoptoz ve nekroz sonucunda pasif, eksozom ve viral partikül salgılanması sonucu aktif olarak seruma geçebilir (100). Bazı miRNAların serumdaki seviyelerinin karaciğerdeki miRNA seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (101). Serbest RNA, RNazlar tarafından hızla parçalanır ve tipik olarak kısa bir yarı ömre sahiptir. Bunun aksine, olgun miRNA'lar çok daha stabildir ve normalde AGO2 veya diğer argonaut proteinleriyle kompleks oluştururlar (149). Böylece dolaşımda yıkılmadan kalırlar. miRNA'lar çok sayıda metabolik yolun düzenlenmesinde rol oynar ve serum miRNA profillerindeki değişiklikler altta yatan karaciğer hasarını veya inflamasyonu yansıtabilir (91).

Karaciğerde en fazla bulunan ve toplam miRNA'ların %70'ini oluşturan miRNA-122, kolesterol biyosentezi, yağ asidi sentezi ve oksidasyon dahil olmak üzere metabolik yolları düzenler. miRNA-122, HCV RNA'nın 5' UTR'deki IRES bölgesine bağlanarak konak ribozomlarıyla etkileşimini stabilize eder ve viral genom çevirisine izin verir. miR-122, HCV replikasyonu için en önemli konak faktörlerinden biri olarak gösterilmiştir (152). Klinik olarak, miRNA-122'nin karaciğer hasarıyla korele olduğu gösterilmiştir (153). Bu nedenle, miRNA-122'nin karaciğer hasarı için yeni bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir(154). Çalışmamızda kontrol grubu ile HCV ile enfekte hastaların plazma miRNA 122 seviyelerini karşılaştırdık, iki grup arasında anlamlı bir fark bulamadık (Bkz. Tablo 14, Şekil 5). Literatüre baktığımızda da hastaların miRNA 122 seviye değişimleri hakkında farklı sonuçlar bulunmaktadır.

Amr ve ark. yaptığı çalışmada, serum miRNA-122 seviyeleri kronik HCV'li hastalarda, sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde yüksek iken; HCV ile enfekte HSK hastalarında serum miRNA-122 seviyeleri hem kronik HCV'li hastalara göre hem kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (143). Benzer şekilde El-Ahwany ve ark. genotip 4 HCV ile enfekte hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada, kronik HCV'li ve HCV nedeniyle siroz olmuş hasta gruplarındaki serum miRNA-122 seviyeleri sağlıklı kontrollerin serum miRNA-122 seviyelerine göre anlamlı şekilde yüksek saptanmışken; HSK hasta grubunun serum miRNA-122 seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (146). Yapılan bazı çalışmalarda HCV ile enfekte hasta gruplarının dolaşımda miRNA-122 seviyeleri kontrol grubununkilere göre yüksek saptanmıştır (155-157). Ancak bazı çalışmalarda ise HCV ile enfekte hasta gruplarının dolaşımdaki miRNA-122 seviyeleri kontrol grubununa

göre anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüştür (148, 158). El-Abd ve ark. 2015'te yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamız ile benzer olarak HCV ile enfekte hasta gruplarının serum miRNA-122 sevipleri ile kontrol grubununkiler arasında anlamlı fark bulunamamıştır (147). Sonuç olarak bazı çalışmalarda HCV'ye bağlı HSK hastalarında azalmış bulunurken, diğer gruplarda artmış bulunmuş. HCV gruplarında artması beklenmesine rağmen azalmış bulan birçok çalışma da vardır. Bizim çalışmamızla benzer şekilde değişmemiş bulan çalışmalar da vardır. Bu durumun, HCV ile enfekte hastalarımızı HSK veya siroz gibi gruplara ayırmamamızdan kaynaklanmış olabileceğini düşünüyoruz.

HCV ile enfekte hastalarda dolaşımdaki monositlerde artan miRNA-155, TNF- α üretiminin artmasına neden olur. miRNA-155, TNF- α 'yı pozitif olarak düzenleyerek ilk enfeksiyon sırasında yüksek ve stabil bir seviyede tutar. Öte yandan miRNA-155, CHC hastalarında bağışıklık temizliği ve bağışıklık hasarı arasındaki dengeyi korumak için Tim-3 tarafından doğal öldürücü hücrelerde IFN γ üretimini düzenler (159). Kronik inflamasyon dünya çapındaki tüm kanser vakalarının yaklaşık %25'ine katkıda bulunur. Aynı zamanda birçok çalışma miRNA-155 seviyelerinin Burkitt lenfoması, akciğer kanseri ve HSK'dan kaynaklanan tümörlerde önemli ölçüde arttığını bildirmiştir (160). HCV hastalarında miRNA-155, Wnt sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla hepatosit proliferasyonunu ve tümör oluşumunu destekler. miRNA-155'in aşırı ekspresyonunun β -katenin'i aktive ettiği ve hücre proliferasyonunu destekleyen siklin D1, c-myc ve hayatta kalmada artışa neden olduğu gösterilmiştir. İlâveten, miRNA-155 ayrıca hepatosit proliferasyonunu ve tümör oluşumunu artırmak için negatif bir Wnt sinyal düzenleyicisi olan adenomatöz polipozis koli'yi (APC) de azalttığı gösterilmiştir (161).

Karaciğer dokularından yapılan ekstraksiyonlarla yapılan çalışmalarda miRNA 155'in HCV ile enfekte hasta gruplarının karaciğer dokularında, sağlıklı kontrollerin karaciğer dokularındakine göre anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (160, 162). Benzer şekilde HCV ile enfekte hastaların serum miRNA-155 seviyelerini sağlıklı kontrollerle kıyaslayan çalışmalarda HCV ile enfekte hastaların miRNA-155 seviyeleri kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (156, 157). Bu bulguların aksine çalışmamızda hasta grubunun miRNA-155 ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldı (Bkz. Tablo 14, Şekil 5). Buna göre miRNA-155 ekspresyonlarının hasta

grubunda anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p=0,014$). miR-155'in HCV enfeksiyonu için tanı koydurucu olup olmadıklarını anlamak için ROC analizi yapıldı (Bkz. Tablo 18, Şekil 6). miRNA-155'in istatistiksel olarak anlamlı şekilde hasta ve sağlıklı kişiler üzerinde ayırt edici olduğu görüldü ($p=0,014$). miRNA-155 %64,3 oranında hasta ve sağlıklı kişileri ayırt etti. Bulgularımız literatür ile çelişmektedir. Fakat literatürde çalışmamızla uyumlu şekilde HCV ile enfekte hasta serumlarındaki miRNA-155 seviyelerinin, kontrol grubundakilere göre anlamlı şekilde düşük olduğu bir çalışma da mevcuttur. Fan ve ark. yaptığı bu çalışmada yine bizim çalışmamıza benzer şekilde serum miRNA-155 ile miRNA-122 arasında anlamlı ve pozitif yönlü korele olduğu gösterilmiştir (158).

miRNA-21, HCV tarafından tetiklenen tip I IFN üretimini baskılar ve böylece HCV replikasyonunu teşvik eder. Ayrıca, HCV kaynaklı tip I IFN üretiminde rol alan miyeloid farklılaşma faktörü 88 (MyD88) ve interlökin-1 reseptörüyle ilişkili kinaz 1'i (IRAK1) hedef alır. Böylece HCV'nin konak bağışıklık sisteminden kaçmasına katkıda bulunur (163). Aynı zamanda miRNA-21 TGF- β sinyalleşmesinin bir baskılayıcısı olan SMAD7'yi doğrudan hedefleyerek fibrozise yol açar. miRNA-21 ayrıca, PTEN/AKT yolunu düzenleyerek hepatik fibroz sırasında insan hematopoietik kök hücrelerini aktive edebilir. miRNA-21, doğrudan tümör baskılayıcı PTEN ile etkileşir, böylece hepatoma hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu kolaylaştırır. Böylece HSK gelişimine katkıda bulunur (15).

Çalışmamızda hasta grubunun miRNA-21 ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldı (Bkz. Tablo 14, Şekil 5). Buna göre miRNA-21 ekspresyonlarının hasta grubunda anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0,0001$). miRNA-21'in HCV enfeksiyonu ile ilişkili olup olmadığını anlamak için tek değişkenli lojistik regresyon analizi yapıldı (Bkz. Tablo 16). miRNA-21 parametrelerinin anlamlı şekilde HCV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu ve HCV enfeksiyonunu tahmin edebileceği görüldü. İlişkili parametrelerin bağımsız etkilerinin değerlendirilmesi için çok değişkenli lojistik regresyon analizi yapıldı (Bkz. Tablo 17). miRNA-21'in ($OD=0,0039$) HCV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu ve azalan miRNA 21 seviyelerinin HCV enfeksiyonu için tanımlayıcı potansiyele sahip olduğu bulundu. Analiz edilen miRNA'ların HCV enfeksiyonu için tanı koydurucu olup olmadıklarını anlamak için ROC analizi yapıldı (Bkz. Tablo 18, Şekil 6). ROC analizinde miRNA-21 için EAA 0,951, p değeri $<0,001$

olarak hesaplandı ve miRNA-21'in istatistiksel olarak anlamlı şekilde hasta ve sağlıklı kişiler üzerinde ayırt edici olduğu görüldü. miRNA-21 %95,1 oranında hasta ve sağlıklı kişileri ayırt etti.

El-Guendy ve ark. yaptığı çalışmada, bizim çalışmamızla benzer olarak miRNA-21'in HCV ile enfekte hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde azaldığını göstermiştir. Yine aynı şekilde bu çalışmada bizim çalışmamızla benzer şekilde analiz edilen miRNA'ların (miRNA 122, 155 ve 21) ifade düzeyleri ile incelenen hastaların yaş, viral yük, serum karaciğer enzimleri düzeyi gibi temel klinik ve biyokimyasal özellikleri arasında anlamlı bir korelasyon gösterilmemiştir (162). Ancak literatürde bizim çalışmamızla çelişkili şekilde miRNA-21'in HCV ile enfekte hasta gruplarında anlamlı şekilde artmış olduğunu bulan çalışmalar vardır (142, 164). Nasser ve ark. yaptığı çalışmada da HCV ile enfekte hastalarda miRNA-21'in arttığı gösterilirken bizim çalışmamızla benzer şekilde miRNA21 ile karaciğer fonksiyon testleri ile arasında korelasyon bulunamamıştır (165). Cermelli ve ark. yaptığı çalışmada ise serum miRNA-21 düzeyleri ile HCV enfeksiyonu ile anlamlı şekilde değişmemiştir (155). Görüldüğü üzere literatürde birçok farklı sonuç bulan çalışmalar vardır. miRNA-21 HSK gelişiminde katkısı olan miRNA'lar arasındadır ve bu tutarsız sonuçlar çalışmalardaki HCV ile enfekte hastaları HCV ilişkili HSK, ya da HCV ilişkili siroz gibi gruplara ayrılmadığından kaynaklanmış olabilir.

miRNA-224 SMAD4 genini susturarak HSK gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca hücre siklusunda görevli p21 ve p27 proteinlerinin ekspresyonlarını kısıtlayarak hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiş ve bu yolak üzerindeki etkisiyle HSK'da migrasyona ve invazyona neden olduğu bilinmektedir. Bunların da yanında metalloproteinaz 9 ve PAK4 proteinleri ekspresyonlarını azaltarak kanserleşmiş hepaositlerin migrasyon ve invazyon yeteneklerini arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (104). miRNA-224 aynı zamanda apoptoz inhibitörü 5'i (API-5) hedefleyerek ve hücre büyümesini teşvik ederek tümör hücresi apoptozunu inhibe ederek HSK gelişimine katkıda bulunur (143). Yapılan çalışmalar sadece HSK'da değil sirotik karaciğer dokularında, hepatoselüler adenom gibi iyi huylu karaciğer adenomlarında ve hatta kronik hepatitte miRNA-224 ekspresyonunun arttırdığını göstermiştir (105). Enflamatuar yollardan p65/NF- κ B yoluna da etki ederek karaciğer hasarını indüklediği gösterilmiştir (143).

Çalışmamızda hasta grubunun miRNA-224 ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve miRNA-224 ekspresyonları açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır (Bkz. Tablo 14, Şekil 5). Çin’de yapılan bir çalışmada HCV’li hastalar kronik HCV enfeksiyonlu, siroz ve HSK olarak üçe ayrılmış bu üç grupta da serum miRNA-224 seviyeleri kontrole göre anlamlı şekilde artmış olduğu bulunmuştur (166). Mısır’da yapılan bir çalışmada Çin’de yapılan çalışma ile uyumlu olarak HCV ile enfekte HSK’lı hastalarda serum miRNA-224 anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (144). Mısır’da Amr ve ark. çalışmasında ise bu çalışmalarla uyumlu olarak HCV enfeksiyonlu HSK hastalarında serum miRNA-224 seviyeleri kontrol grubundakilere göre anlamlı şekilde artarken; bizim çalışmamızla benzer şekilde kronik HCV enfeksiyonluların serum miRNA-224 seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunamamıştır (143). Serum miRNA-224’ün HCV ile ilişkili HSK hastalarında artması beklenirken; her ne kadar enflamatuvar yolaklarla ilgili olsa da kronik HCV hastalarında ise kontrollere göre artması veya değişmemesi beklenen bir durumdur. Fakat birçok miRNA’da olduğu gibi miRNA-224 için de, tedavi gibi birçok nedenden etkilenebileceği için farklı sonuçların da karşımıza çıkabileceği belirtilmiştir (167).

Farklı karaciğer hücrelerindeki miRNA sentez profillerini değerlendiren çalışmaların sonuçları tutarlı değildir. Ayrıca, klinik örneklerdeki farklılıklar, miRNA analizlerindeki farklı miRNA matrisleri, çalışmalar arasındaki farklı miRNA ifade dereceleri gibi çeşitli teknik sorunlar, miRNA profilinin progenitör hücrenin kökeninden de etkilenmesi, miRNA profillerini karşılaştırmanın zor olduğunu göstermektedir (97). HCV’ye yönelik tedavilerin de miRNA sentezlerini de etkilediği bilinmektedir (156). “Housekeeping” gen seçiminde de bazı genlerin fibrozis durumunda ekspresyonlarının değişebileceği ve bunun da sonuçları etkileyebileceği düşünülmektedir. Aynı ailedeki değişken uzunluktaki izomiR’ler ile yakından ilişkili miRNA’lar arasında ve olgun miRNA’lar ile pre-/pri-miRNA’lar arasında ayırım yapmak ek bir zorluk oluşturmaktadır. Bütün bunlar hastalık tanılarında miRNA’ların kullanılması için standartizasyon çalışmalarının devam etmesi gerektiğini bize göstermektedir. Serumdan RNA izolasyonunda birçok yöntem olmasına rağmen miRNA’ların düşük miktarı, kısalığı ve yüksek dizi değişkenliği miRNA’ların ölçümünü zorlaştırır (91). Bütün bunlar beraber değerlendirildiğinde miRNA’lar HCV

tanısı için umut vermekle beraber güvenilir bir biyobelirteç olarak kabul edilmesi için standartlaştırılmış yöntemlere ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

1- 13 hastanın (%26) genotip 1a, 14 hastanın (%28) genotip 1b, 1 hastanın (%2) genotip 2, 22 hastanın (%44) genotip 3 olduğu tespit edildi.

2- Genotip 1a ve 3 ile enfekte olan hastalarda erkeklerin anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü ($p=0,001$).

3- Genotip 1b ile enfekte hastaların genotip 1a ve 3 ile enfekte hastalardan anlamlı şekilde daha ileri yaşta olduğu görüldü ($p=0,004$). Her 3 genotip arasında AST, ALT, ALP ve HCV RNA değerleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

4- Kontrol grubunun 28'i (%56) kadın, 22'si (%44) erkek, hastaların ise 16'sı (%32) kadın, 34'ü (%68) erkekti. Hasta grubunda erkek sayısının anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü ($p=0,016$).

5- Kontrol grubunun yaş ortalaması $36,42 \pm 9,22$ iken hasta grubunun yaş ortalaması $32,18 \pm 11,71$ olarak bulundu. Bu bulgulara göre hasta grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha gençti ($p=0,005$).

6- Hasta grubunun AST, ALT ve ALP değerlerinin, kontrol grubununkilere göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,0001$).

7- Hasta grubunun HCV RNA değerlerinin ortalaması $1622592,06 \pm 2830469,7$ IU/L olarak bulundu.

8- Hasta ile kontrol grupları arasında miRNA-122 ve miRNA-224 ekspresyonları açısından anlamlı fark bulunamazken, miRNA-155 ($p=0,014$), miRNA-21 ($p<0,0001$) ekspresyonlarının hasta grubunda anlamlı şekilde azaldığı görüldü.

9- miRNA seviyeleri ile laboratuvar bulguları arasında anlamlı korelasyon olmadığı görülürken, 4 miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin birbirleri arasında pozitif yönlü korelasyon olduğu bulundu.

10- Cinsiyet, yaş, ALT, AST, ALP, miRNA-21 parametrelerinin anlamlı şekilde HCV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu ve HCV enfeksiyonunu tahmin edebileceği görüldü.

11- AST ve miRNA-21 parametreleri HCV enfeksiyonu ile ilişkili bulundu. Artan AST veya azalan miRNA 21 seviyeleri HCV enfeksiyonu için tanımlayıcı potansiyele sahiptir.

12- ROC analizine göre miRNA-155 ve miRNA-21'in istatistiksel olarak anlamlı şekilde hasta ve sağlıklı kişiler üzerinde ayırt edici olduğu görüldü. miRNA-155 %64,3 oranında hasta ve sağlıklı kişileri ayırt edebiliyorken; miRNA-21 %95,1 oranında hasta ve enfekte kişileri ayırt etti.

13- Her üç genotip arasında miRNA-122, miRNA-155, miRNA-224 ve miRNA-21 ekspresyon seviyeleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

14- ROC analizi bize miRNA 21 ve miRNA155'in HCV enfeksiyonu tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürdü.

15- miRNA'lar biyobelirteç olarak büyük umutlar vaat etse de, ölçüm aşamalarındaki zorlukları, enfekte hücrelerdeki değişimleri gibi faktörlerden dolayı standartizasyonları için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

16- Çalışmamızda ülkemizdeki baskın HCV genotipinin, göç, madde kullanımının artması gibi faktörler nedeniyle değişmiş olabileceğine dair bulgular elde edilmiş olup konu hakkında kapsamlı bir çalışma yapılmasına ve HCV yaygınlığının azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmasına ihtiyaç olduğu ortaya çıkmıştır.

17- Çalışmamızda hastaların hangi bulaş yoluyla enfekte olduğu ile ilgili veriler toplanmamıştır. Dolayısıyla çalışmamızda HCV'nin bulaş yolları ile etken HCV genotipi ilişkisini gösteremedik.

18- miRNA ekspresyonlarının hastaların klinik evrelerinden ve gidişatlarından etkilendiği tartışma kısmında belirttiğimiz gibi birçok çalışmada gösterilmiştir. Ancak çalışmamızda hasta grubunun klinik durumu ve ya tedavi alıp almaması ile ilgili veri toplanmaması çalışmamızın eksiklikleri arasında sayılabilir.

19- Çalışmamızda kontrol ve hasta gruplarının plazmalarından total RNA elde farklı kit ve cihazlarda yapılması da miRNA'ların düzeylerinin karşılaştırılması konusunda kısıtlılık oluşturmaktadır.

KAYNAKÇA

1. Bradley DW, Krawczynski K, Beach MJ, Purdy MA, editors. Non-A, non-B hepatitis: toward the discovery of hepatitis C and E viruses. Seminars in Liver Disease; 1991: © 1991 by Thieme Medical Publishers, Inc.
2. Organization WH. Global hepatitis report 2024: World Health Organization; 2024.
3. Confirmed HCV genotypes/subtypes: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). https://ictv.global/sg_wiki/flaviviridae/hepacivirus/table1 Erişim tarihi: 26.09.2024
4. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. Journal of Hepatology. 2014;61(1):45-57.
5. Us T, Kasifoglu N, Aslan FG, Aslan M, Akgun Y, Durmaz G. The distribution of hepatitis C virus genotypes of patients with chronic hepatitis C infection in Eskisehir Region of Turkey. Journal of Clinical Virology. 2016;82:S70.
6. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. Hepatology. 2004;39(4):1147-71.
7. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. World Journal of Gastroenterology. 2007;13(17):2461.
8. Nolte FS, Green AM, Fiebelkorn KR, Caliendo AM, Sturchio C, Grunwald A, et al. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region. Journal of Clinical Microbiology. 2003;41(4):1558-64.
9. Türkoğlu S. Hepatit C Virusu Viroloji ve Seroloji. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E, editors. Viral Hepatit 2007. 1. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği; 2007. p. 228-45.
10. Kırdar S, Yaşa MH, Aydın N, Korkmaz Gültekin B, Öztürk ŞB, Kurt Ömürlü İ. Kronik hepatit C enfeksiyonlu hastalarda hepatit C virüsü genotiplerinin dağılımı. Meandros Medical and Dental Journal. 2015;16(3):108-13.

11. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*. 2004;14(10a):1902-10.
12. Roberts AP, Lewis AP, Jopling CL. miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(17):7716-29.
13. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(30):10513-8.
14. Mjelle R, Dima SO, Bacalbasa N, Chawla K, Sorop A, Cucu D, et al. Comprehensive transcriptomic analyses of tissue, serum, and serum exosomes from hepatocellular carcinoma patients. *BMC Cancer*. 2019;19:1-13.
15. Li H-C, Yang C-H, Lo S-Y. Roles of microRNAs in Hepatitis C Virus Replication and Pathogenesis. *Viruses*. 2022;14(8):1776.
16. Prince A, Grady G, Hazzi C, Brotman B, Kuhns W, Levine R, et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet*. 1974;304(7875):241-6.
17. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359-62.
18. Abacıoğlu YH, Öktem İMA. Hepatit C. In: Us D, Ergünay K, editors. *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. Ankara: Ankara Tıp Bilimsel Yayınevi; 2012. p. 336-65.
19. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*. 2004;39(1):5-19.
20. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5(6):453-63.
21. Altındış M, Tabak F. *Hepatit Mikrobiyolojisi*. 1 ed. İstanbul İstanbul Tıp Kitapevi; 2015. 83-113 p.
22. Suzuki T. Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:38.

23. Akhan S. Hepatit C Virüsü. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2: Nobel Tıp Kitapevleri; 2012. p. 1911-28.
24. Ray SC, Thomas DL. Hepatitis C. In: Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Mandell, Douglas and Bennett' s Principles and Practice of Infectious Diseases. 8 ed 2015. p. 1904-27.
25. Altındış M, Tabak F. Hepatit Mikrobiyolojisi. 1 ed. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi; 2015. 159-92 p.
26. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;96(1):224-30.
27. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *New England Journal of Medicine*. 1996;334(2):77-81.
28. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, De Jong YP, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*. 2009;457(7231):882-6.
29. Forghieri F, Luppi M, Barozzi P, Maffei R, Potenza L, Narni F, et al. Pathogenetic mechanisms of hepatitis C virus-induced B-cell lymphomagenesis. *Clinical Developmental Immunology*. 2012.
30. Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, Choo Q-L, Houghton M, Ralston R, et al. Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *Journal of Virology*. 1993;67(12):7522-32.
31. Petruzzello A, Coppola N, Loquercio G, Marigliano S, Giordano M, Azzaro R, et al. Distribution pattern of hepatitis C virus genotypes and correlation with viral load and risk factors in chronic positive patients. *Intervirology*. 2014;57(6):311-8.
32. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*. 1999;17(1):189-220.

33. Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Human immunology*. 1999;60(7):562-7.
34. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*. 2005;42(4):501-10.
35. Thimme R, Oldach D, Chang K-M, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2001;194(10):1395-406.
36. Tang H, Grisé H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clinical Science*. 2009;117(2):49-65.
37. Yenen OŞ. Hepatit C Virüsü. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 2: Nobel Tıp Kitapevleri; 2012. p. 1377-408.
38. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013;57(4):1333-42.
39. Chakravarti A, Ashraf A, Malik S. A study of changing trends of prevalence and genotypic distribution of hepatitis C virus among high risk groups in North India. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2013;31(4):354-9.
40. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature reviews Gastroenterology Hepatology*. 2013;10(9):553-62.
41. Mühlberger N, Schwarzer R, Lettmeier B, Sroczynski G, Zeuzem S, Siebert U. HCV-related burden of disease in Europe: a systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity, and mortality. *BMC Public Health*. 2009;9(1):1-14.
42. Tozun N, Ozdogan O, Cakaloglu Y, Idilman R, Karasu Z, Akarca U, et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections and risk factors in Turkey: a fieldwork TURHEP study. *Clinical Microbiology Infection*. 2015;21(11):1020-6.
43. Ecemis T, Akçali S, Dündar PE, Sanlıdag T. HCV Enfeksiyonu Tanisinda Anti-HCV Testi ve Esik Deger/The Threshold Value of Anti-HCV Test in the Diagnosis of HCV Infection. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2012;32(6):1648.

44. Bakanlığı TCS. Türkiye Viral Hepatit Önleme ve Kontrol Programı 2018-2023. Ankara: T. C. Sağlık Bakanlığı, 2018.
45. Ji-su L, Shu-ping T, Vitvitski L, Lepot D, Trepo C. Two French genotypes of hepatitis C virus: homology of the predominant genotype with the prototype American strain. *Gene* 1991;105(2):167-72.
46. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318-27.
47. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infectious Diseases*. 2005;5(9):558-67.
48. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2015;61(1):77-87.
49. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000;13(2):223-35.
50. Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends in Microbiology*. 1999;7(10):402-10.
51. Domingo E. Biological significance of viral quasispecies. *Viral Hepatitis Reviews* 1996;2:247-61.
52. Aydemir S. Antiviral Direnç. In: Kandemir Ö, Danalıoğlu A, editors. *Hepatit B'den D'ye Hep Güncel*. İstanbul: Content Ed Net; 2015. 214-26.
53. Maheshwari A, Thuluvath PJ. Management of acute hepatitis C. *Clinics in liver Disease*. 2010;14(1):169-76.
54. Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. *Journal of Hepatology*. 2006;45(4):607-16.
55. Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC, et al. Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *New England Journal of Medicine*. 1996;335(9):631-4.
56. Nelson PK, Mathers BM, Cowie B, Hagan H, Des Jarlais D, Horyniak D, et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet*. 2011;378(9791):571-83.

57. Fabrizi F, Messa P. Transmission of hepatitis C virus in dialysis units: a systematic review of reports on outbreaks. *International Journal of Artificial Organs*. 2015;38(9):471-80.
58. Fissell RB, Bragg-Gresham JL, Woods JD, Jadoul M, Gillespie B, Hedderwick SA, et al. Patterns of hepatitis C prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents: the DOPPS. *Kidney International*. 2004;65(6):2335-42.
59. Mitsui T, Iwano K, Masuko K, Yamazaki C, Okamoto H, Tsuda F, et al. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology*. 1992;16(5):1109-14.
60. Walsh K, Alexander G. Update on chronic viral hepatitis. *Postgraduate Medical Journal*. 2001;77(910):498-505.
61. Brandão A, Costa Fuchs S. Risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in southern Brazil: a case-control study. *BMC Gastroenterology*. 2002;2(1):1-8.
62. Dusheiko G, Smith M, Scheuer P. Hepatitis C virus transmitted by human bite. *Lancet*. 1990;336(8713):503-4.
63. Mast EE, Hwang L-Y, Seto DS, Nolte FS, Nainan OV, Wurtzel H, et al. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005;192(11):1880-9.
64. Fischler B, editor Hepatitis C virus infection. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*; 2007: Elsevier.
65. Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(S1):99-105.
66. Kupfer B. HCV Virology. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H, editors. *Hepatology*. Hannover2022. 109-35.
67. Akıncı E, Bodur H. HCV Enfeksiyonunda Klinik ve Tanı. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E, editors. *Viral Hepatit 2007*. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği; 2007. 200-26.
68. Erdem H, Eyigün CP. Hepatit C İnfeksiyonunun Patogenezi ve Doğal Seyri. In: Köksal İ, Leblebicioğlu H, editors. *Kronik Hepatitlerin Tanı ve Tedavisine Güncel Yaklaşımlar*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2009. 40-50.

69. Vandelli C, Renzo F, Romanò L, Tisminetzky S, De Palma M, Stroffolini T, et al. Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. *American College of Gastroenterology*. 2004;99(5):855-9.
70. Demir M. HCV Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Testler. In: Kandemir Ö, Danalıoğlu A, editors. *Hepatit B'den D'ye Hep Güncel*. İstanbul: Content Ed Net; 2015. 143-50.
71. Carreño V, Bartolomé J, Castillo I, Quiroga JA. New perspectives in occult hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*. 2012;18(23):2887.
72. Liang TJ, Heller T. Pathogenesis of hepatitis C—associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5):S62-S71.
73. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver International*. 2009;29:74-81.
74. Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, Hayden TM. Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55:S43-S8.
75. Cacoub P, Comarmond C, Domont F, Savy L, Desbois AC, Saadoun D. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. 2016;3(1):3-14.
76. Sainz Jr B, Barretto N, Uprichard SL. Hepatitis C virus infection in phenotypically distinct Huh7 cell lines. *PloS One* 2009;4(8):e6561.
77. Estrabaud E, Vidaud M, Marcellin P, Asselah T. Genomics and HCV infection: progression of fibrosis and treatment response. *Journal of Hepatology*. 2012;57(5):1110-25.
78. Kesli R. An overview of the laboratory assay systems and reactives used in the diagnosis of Hepatitis C virus (HCV) infections. In Abuelzein E. ed. *Trends in Immunolabelle Related Techniques*. Rijeka: Croatia. In Tech Publishing House 2012:339-50.
79. Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, Noventa F, Pontisso P, et al. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet*. 1992;340(8821):697-8.
80. Craxì A, Laffi G, Zignego AL. Hepatitis C virus (HCV) infection: a systemic disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2008;29(1-2):85-95.

81. Gupta E, Bajpai M, Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian Journal of Transfusion Science*. 2014;8(1):19.
82. Us D. *Temel İmmünoloji ve Seroloji*. Ankara: Hipokrat Kitabevi; 2016. 232-46 p.
83. Li H-C, Lo S-Y. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. *World Journal of Hepatology*. 2015;7(10):1377.
84. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics*. 2009;41(10):1105-9.
85. Bowden DS, Berzsenyi MD. Chronic hepatitis C virus infection: genotyping and its clinical role. *Future Microbiology*. 2006;1(1):103-12.
86. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus (HCV) genotype 1 subtype identification in new HCV drug development and future clinical practice. *PLoS One*. 2009;4(12):e8209.
87. Chen H, Xu Z, Liu D. Small non-coding RNA and colorectal cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2019;23(5):3050-7.
88. 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(5):843-54.
89. Öksüz Z, Serin M. Hepatit C Virusu İnfeksiyonunda ve Hepatit C Virusu İlişkili Komplikasyonlarda MikroRNA'ların Rolü. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2014;7(1):1-11.
90. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*. 2009;19(1):92-105.
91. Hayes CN, Chayama K. MicroRNAs as biomarkers for liver disease and hepatocellular carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(3):280.
92. Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*. 2008;452:896-9.
93. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9:402.

94. Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the seed supports microRNA targeting specificity. *Molecular Cell*. 2016;64(2):320-33.
95. Moleküler, Biyoloji, ve, Genetik. <http://molekulerbiyolojivegenetik.org/yeni-bir-kesif-gen-baskilayicilari-mirinalar> Erişim tarihi:23.05.2023.
96. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How Huang K, Jen Lee M, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*. 2010;56(11):1733-41.
97. Loureiro D, Tout I, Narguet S, Benazzouz SM, Mansouri A, Asselah T. miRNAs as Potential Biomarkers for Viral Hepatitis B and C. *Viruses*. 2020;12(12).
98. Bala S, Marcos M, Szabo G. Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(45):5633.
99. Ji F, Yang B, Peng X, Ding H, You H, Tien P. Circulating microRNAs in hepatitis B virus–infected patients. *Journal of Viral Hepatitis*. 2011;18(7):e242-e51.
100. Novellino L, Rossi RL, Bonino F, Cavallone D, Abrignani S, Pagani M, et al. Circulating hepatitis B surface antigen particles carry hepatocellular microRNAs. *PloS One*. 2012;7(3):e31952.
101. Shwetha S, Gouthamchandra K, Chandra M, Ravishankar B, Khaja M, Das S. Circulating miRNA profile in HCV infected serum: novel insight into pathogenesis. *Scientific Reports*. 2013;3(1):1555.
102. Fu X, Wen H, Jing L, Yang Y, Wang W, Liang X, et al. Micro RNA-155-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by suppressing PTEN through the PI 3K/Akt pathway. *Cancer Science*. 2017;108(4):620-31.
103. Oura K, Morishita A, Masaki T. Molecular and functional roles of microRNAs in the progression of hepatocellular carcinoma—a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21):8362.
104. Chen W, Fan X-m, Mao L, Zhang J-y, Li J, Wu J-z, et al. MicroRNA-224: as a potential target for miR-based therapy of cancer. *Tumor Biology*. 2015;36:6645-52.
105. Wang Y, Lee CG. Role of miR-224 in hepatocellular carcinoma: a tool for possible therapeutic intervention? *Epigenomics*. 2011;3(2):235-43.
106. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(9):e45-e.
107. Razavi H, Robbins S, Zeuzem S, Negro F, Buti M, Duberg A-S, et al. Hepatitis C virus prevalence and level of intervention required to achieve the WHO targets for

elimination in the European Union by 2030: a modelling study. *Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2017;2(5):325-36.

108. Midgard H, Weir A, Palmateer N, Re III VL, Pineda JA, Macías J, et al. HCV epidemiology in high-risk groups and the risk of reinfection. *Journal of Hepatology*. 2016;65(1):S33-S45.

109. Blach S, Zeuzem S, Manns M, Altraif I, Duberg A-S, Muljono DH, et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterology & Hepatology* 2017;2(3):161-76.

110. Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Hepatitis C virus: viral quasispecies and genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;19(1):23.

111. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cacciapuoti C. Hepatitis C virus (HCV) genotypes distribution: an epidemiological up-date in Europe. *Infectious Agents Cancer*. 2016;11:1-9.

112. Buruk C, Bayramoğlu G, Reis A, Kaklıkaya N, Tosun I, Aydin F. Determination of hepatitis C virus genotypes among hepatitis C patients in Eastern Black Sea Region, Turkey. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2013;47(4).

113. Kaya S, Afşar İ, Gökmen AA, Şener AG, Sayiner A. Evaluation of Hepatitis C Virus Genotype Results in İzmir Atatürk Training and Research Hospital. *Viral Hepatitis Journal*. 2019;25(2).

114. Bozok TŞ, Çelik AK. Kronik Hepatit C enfeksiyonu olan hastaların Hepatit C virüs genotip ve viral yüklerinin değerlendirilmesi: Beş yıllık tek merkezli retrospektif çalışma. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2023;16(1):75-82.

115. Caliskan A, Kirisci O, Ozkaya E, Ozden S, Tumer S, Caglar S, et al. Distribution and predominance of genotype 3 in hepatitis C virus carriers in the province of Kahramanmaraş, Turkey. *Hepatitis Monthly*. 2015;15(4).

116. Ağca H, Ener B, Sağlık İ, Yılmaz E, Kazak E. Hepatit C Virüsü Genotiplerinin Retrospektif İncelenmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2021;51(3):303-8.

117. Sağlık İ, Mutlu D, Öngüt G, İnan D, Öğünç D, Can Sarınoğlu R, et al. Akdeniz Üniversitesi Hastanesinde kronik hepatit C enfeksiyonu olan hastalarda hepatit C virus genotipleri: beş yıllık sonuçların değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2014;48(3):429-37.

118. Daloglu AE, Parkan ÖM, Erdogan A, Peker BO, Sarinoglu RC, Saglik I, et al. Damar İçi madde bagimliliği olan ve madde bagimlisi olmayan hastalar arasında hepatit C virus (HCV) genotiplerinin dagilimi. Mikrobiyoloji Bülteni. 2021;55(1):30-40.
119. Kayman T, Karakükçü Ç, Karaman A, Gözütok F. Kayseri bölgesinde Hepatit C virüs enfeksiyonunun genotip dağılımı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2012;42(1):21-6.
120. Üçbilek E, Abayli B, Koyuncu MB, Midikli D, Gözüküçük S, Akdağ A, et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes among intravenous drug users in the Çukurova region of Turkey. Turkish Journal of Medical Sciences. 2016;46(1):66-71.
121. Yetim A, Şahin M. İntravenöz Madde Bağımlısı Gençlerde Hepatit C Virusu (HCV) İnfeksiyonu: Sosyodemografik Değerlendirme ve HCV Genotip Analizi. Klimik Dergisi. 2018;31(3).
122. Robaeys G, Bielen R, Azar DG, Razavi H, Nevens F. Global genotype distribution of hepatitis C viral infection among people who inject drugs. Journal of Hepatology. 2016;65(6):1094-103.
123. Rodgers MA, Gomathi S, Vallari A, Saravanan S, Lucas GM, Mehta S, et al. Diverse HCV strains and HIV URFS identified amongst people who inject drugs in India. Scientific Reports. 2020;10(1):7214.
124. Wang M, Liao Q, Xu R, Song D, Huang J, You Q, et al. Hepatitis C virus 3b strains in injection drug users in Guangdong Province, China, may have originated in Yunnan Province. Archives of Virology. 2019;164:1761-70.
125. Bulut D, Sayar MS. The Genotype of Hepatitis C Distribution in Van and Evaluation of the predicted Risks For Transmission. Van Medical Journal.30(4):332-8.
126. Selek MB, Baylan O, Karagöz E, Özyurt M. Changes in hepatitis C virus genotype distribution in chronic hepatitis C infection patients. Indian Journal of Medical Microbiology. 2018;36(3):416-21.
127. Öztürk AB, Doğan ÜB, Öztürk NA, Özyazıcı G, Demir M, Akin MS, et al. Hepatitis C virus genotypes in Adana and Antakya regions of Turkey. Turkish Journal of Medical Sciences. 2014;44(4):661-5.

128. Kartashev V, Döring M, Nieto L, Coletta E, Kaiser R, Sierra S, et al. New findings in HCV genotype distribution in selected West European, Russian and Israeli regions. *Journal of Clinical Virology*. 2016;81:82-9.
129. Karabulut N, Alacam S, Yolcu A, Onel M, Agacfidan A. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Istanbul, Turkey. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2018;36(2):192-6.
130. Chakravarti A, Dogra G, Verma V, Srivastava AP. Distribution pattern of HCV genotypes & its association with viral load. *Indian Journal of Medical Research*. 2011;133(3):326-31.
131. Yue Q-h, Zhang X-q, Shang Y, Chen Y-z, Sun W-l, Su M-q, et al. Anti-HCV reactive volunteer blood donors distribution character and genotypes switch in Xi'an, China. *Virology Journal*. 2010;7:1-7.
132. Rong X, Lu L, Wang J, Xiong H, Huang J, Chen J, et al. Correlation of viral loads with HCV genotypes: higher levels of virus were revealed among blood donors infected with 6a strains. *PLoS One*. 2012;7(12):e52467.
133. Ali A, Nisar M, Ahmad H, Saif N, Idrees M, Bajwa MAJVj. Determination of HCV genotypes and viral loads in chronic HCV infected patients of Hazara Pakistan. *Virology Journal* 2011;8:1-6.
134. Mishra BK, Yadav UN, Khatiwada S, Tamang MK, Dahal S, Li Y-P. Hepatitis C virus genotype and its correlation with viral load in patients from Kathmandu, Nepal. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2020;14(12):1470-4.
135. Riaz S, Bashir MF, Haider S, Rahid N. Association of genotypes with viral load and biochemical markers in HCV-infected Sindhi patients. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016;47:980-6.
136. Pollock KG, McDonald SA, Gunson R, McLeod A, Went A, Goldberg DJ, et al. Real-world utility of HCV core antigen as an alternative to HCV RNA testing: Implications for viral load and genotype. *Journal of Viral Hepatitis*. 2020;27(10):996-1002.
137. Kermani FR, Kafi-Abad SA, Hossein KM, Maghsudlu M, Sharifi Z, Mansournia MA. Association of HCV genotype with viral load among Iranian blood donors: a penalized logistic regression. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. 2019;33:149.

138. Hadinedoushan H, Salmanroghani H, Amirbaigy MK, Akhondi-Meybodi M. Hepatitis C virus genotypes and association with viral load in yazd, central province of iran. *Hepatitis Monthly*. 2014;14(3).
139. Küçköztaş MF, Ozgünes N, Yazici S. Investigation of the relationship between hepatitis c virus (HCV) genotypes with HCV-RNA and alanine aminotransferase levels in chronic hepatitis c patients. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2010;44(1):111-5.
140. Borcak D, Çağır Ü, Yalçiner AJAD. Nevşehir ilinde hepatit C virüs genotip dağılımı ile serum alanin amino transferaz ve kantitatif serum HCV RNA düzeyleri ilişkisi. *Ankem Dergisi* 2015;29(1):36-40.
141. Kırışçı Ö, Çalışkan A, Koctürk SA, Erdoğan P, Mustafa G. The relationship between distribution of HCV-RNA and ALT-AST levels with genotypes of hepatitis C virus infected patients. *Viral Hepatit Dergisi*. 2013;19(2).
142. Manzoor S, Malik IR, Jahan S, Sarwar MB, Bashir A, Shams S, et al. Serum microRNAs as predictors for HCV progression and response to treatment in pakistani patients. *Genes*. 2023;14(2):441.
143. Amr KS, Atia HAE, Elbnhawy RAE, Ezzat WM. Early diagnostic evaluation of miR-122 and miR-224 as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Genes Diseases*. 2017;4(4):215-21.
144. Mamdouh S, Khorshed F, Aboushousha T, Hamdy H, Diab A, Seleem M, et al. Evaluation of mir-224, mir-215 and mir-143 as serum biomarkers for HCV associated hepatocellular carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*: 2017;18(11):3167.
145. Khairy RM, Hammad SS, Sayed M, Ahmed HA, Esmail MAM. Serum MicroRNAs as predictors for fibrosis progression and response to direct-acting antivirals treatment in hepatitis C virus genotype-4 Egyptian patients. *International Journal of Clinical Practice*. 2021;75(4):e13954.
146. El-Ahwany E, Mourad L, Zoheiry M, Abu-Taleb H, Hassan M, Atta R, et al. MicroRNA-122a as a non-invasive biomarker for HCV genotype 4-related hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *Archives of Medical Science* 2019;15(6):1454-61.
147. El-Abd NE, Fawzy NA, El-Sheikh SM, Soliman ME. Circulating miRNA-122, miRNA-199a, and miRNA-16 as biomarkers for early detection of hepatocellular

carcinoma in Egyptian patients with chronic hepatitis C virus infection. *Molecular Diagnosis Therapy* 2015;19:213-20.

148. Jiao X, Fan Z, Chen H, He P, Li Y, Zhang Q, et al. Serum and exosomal miR-122 and miR-199a as a biomarker to predict therapeutic efficacy of hepatitis C patients. *Journal of Medical Virology*. 2017;89(9):1597-605.

149. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research* 2011;39(16):7223-33.

150. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.

151. Kerr TA, Korenblat KM, Davidson NO. MicroRNAs and liver disease. *Translational Research*. 2011;157(4):241-52.

152. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005;309(5740):1577-81.

153. Bala S, Petrasek J, Mundkur S, Catalano D, Levin I, Ward J, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology*. 2012;56(5):1946-57.

154. Szabo G, Bala S. MicroRNAs in liver disease. *Nature reviews Gastroenterology Hepatology*. 2013;10(9):542-52.

155. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PloS One*. 2011;6(8):e23937.

156. Hassuna NA, Gamil AN, Mahmoud MS, Mohamed WK, Khairy R. Circulating microRNAs as predictors of response to sofosbuvir+ daclatasvir+ ribavirin in HCV genotype-4 Egyptian patients. *BMC Gastroenterology*. 2022;22(1):499.

157. Bala S, Tilahun Y, Taha O, Alao H, Kodys K, Catalano D, et al. Increased microRNA-155 expression in the serum and peripheral monocytes in chronic HCV infection. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10:1-10.

158. Fan Z, Zhang Q, Chen H, He P, Li Y, Si M, et al. Circulating microRNAs as a biomarker to predict therapy efficacy in hepatitis C patients with different genotypes. *Microbial Pathogenesis*. 2017;112:320-6.

159. Zhou Y, Zhang P, Zheng X, Ye C, Li M, Bian P, et al. miR-155 regulates pro- and anti-inflammatory cytokine expression in human monocytes during chronic hepatitis C virus infection. *Annals of Translational Medicine*. 2021;9(21).
160. Zhang Y, Wei W, Cheng N, Wang K, Li B, Jiang X, et al. Hepatitis C virus-induced up-regulation of microRNA-155 promotes hepatocarcinogenesis by activating Wnt signaling. *Hepatology*. 2012;56(5):1631-40.
161. Ashmawy AM, Elgeshy KM, Salam E-STA, Ghareeb M, Kobaisi MH, Amin HAA, et al. Crosstalk between liver-related microRNAs and Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma patients. *Arab Journal of Gastroenterology*. 2017;18(3):144-50.
162. El-Guendy NM, Helwa R, El-Halawany MS, Abdel Rahman Ali S, Tantawy Aly M, Hasan Alieldin N, et al. The liver microRNA expression profiles associated with chronic hepatitis C virus (HCV) genotype-4 infection: A preliminary study. *Hepatitis Monthly*. 2016;16(4):e33881.
163. Chen Y, Chen J, Wang H, Shi J, Wu K, Liu S, et al. HCV-induced miR-21 contributes to evasion of host immune system by targeting MyD88 and IRAK1. *PLoS Pathogens*. 2013;9(4):e1003248.
164. Bihrer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, Forestier N, Susser S, Hauptenthal J, et al. Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma. *PloS One*. 2011;6(10):e26971.
165. Nasser MZ, Zayed NA, Mohamed AM, Attia D, Esmat G, Khairy A. Circulating microRNAs (miR-21, miR-223, miR-885-5p) along the clinical spectrum of HCV-related chronic liver disease in Egyptian patients. *Arab Journal of Gastroenterology*. 2019;20(4):198-204.
166. Jin X, Zhang Y, Wang H, Zhang Y. Expression and Clinical Values of Serum miR-155 and miR-224 in Chinese Patients with HCV Infection. *International Journal of General Medicine*. 2022;15:1393-403
167. Ezzat W, Amr K, Tawfeek S, Elbatae H, Bayomi E, Heiba A, et al. Serum MicroRNA profiles in chronic hepatitis C Egyptian patients before and after combined sofosbuvir and daclatasvir treatment. *BMC Infectious Diseases* 2024 Jan;9: 24-67.