



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KARACİĞER SPESİFİK MİKRO-RNA 122'NİN
HEPATOSELÜLER KARSİNOMADAKİ YERİ VE ÖNEMİ**

Arş. Gör. Dr. Engin ONAN

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Macit Ü. SANDIKÇI**

ADANA-2012



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KARACİĞER SPESİFİK MİKRO-RNA 122'NİN
HEPATOSELÜLER KARSİNOMADAKİ YERİ VE ÖNEMİ**

Arş. Gör. Dr. Engin ONAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Macit Ü. SANDIKÇI

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu Tarafından
TF2012LTP21 no'lu proje olarak desteklenmiştir**

ADANA-2012

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın oluşmasında ve yürütülmesinde deneyimlerini benimle paylaşan, bilimsel proje desteğinde benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım **Prof. Dr. Macit Ü. SANDIKÇI'ya**, tez konusunu bulmamda, tezin oluşumunda, gelişmesinde bana hep destek olan, diğer hastaneler ve diğer üniversitelerle bağlantı kurmamda yardımcı olan, yoğun temposunda bana zaman ayıran, yardımlarını benden esirgemeyen **Prof. Dr. Hikmet AKKIZ'a**, düzenli, tertipli ve disiplinli çalışmalarıyla asistanlık süresince eğitimimize katkıda bulunan, zora düştüğümüzde haklarımızı savunan anabilim dalı başkanımız **Prof. Dr. Murat SERT'e** çalışmamı yürütürken her türlü bilimsel fikirle yanımda olan **Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÜSKÜDAR'a**, bilimsel proje desteğinde yardımını benden esirgemeyen **Prof. Dr. Birol GÜVENÇ'e**, hasta bulmamda bana yardımcı olan **Doç. Dr. İ. Oğuz KARA**, Onkoloji kayıt hemşiresi **Pınar KUM'a**, özenli çalışmalarıyla bana destek olan hekim arkadaşlarım **Dr. Hilmi Erdem SÜMBÜL**, **Dr. Nurettin AY**, **Dr. Dürdane BAKLALI GÜLTEKİN**, **Dr. Şafak ÖZGÜL**, **Dr. Onur TAKTAKOĞLU**, **Dr. Yurdaer BULUT**, **Dr. Mert TOHUMCUOĞLU**, **Dr. Ahmet FIRAT**, **Dr. Yunus COŞKUN'a**, cerrahi hastalarıyla çalışmama destek olan **Prof. Dr. Haluk DEMİRYÜREK**, **Dr. Gizem ÜNAL**, **Dr. Güney Cem BÜLBÜLOĞLU**, **Dr. Çağlar BOZKURT**, **Dr. Erkan CERİT**, Genel cerrahi servisi sorumlu hemşiresi **Dudu BAYSAL'a**,

Her zaman nazik ve yardımcı tavırlarıyla güler yüzlü gastroenteroloji laboratuvar çalışanları **Ersin AKGÖLLÜ**, **Aynur BEKAR** ve **Selçuk YILDIRIM'a**, gastroenteroloji servis hemşiresi **Hülya KARAMOLLA**, poliklinik sorumlusu **Zuhal KANTARCIOĞLU'na**, transplantasyon ünitesi sorumlu hemşire **Kadriye KEBELİ**, tıbbi personel **İzzet KANLI'ya**, tez ve mesleki anlamda bana katkılarından dolayı hemşire **Nuray ÇAKMAZ KAPLAN'a**, projeme bilimsel maddi destek sağlayan Bayer firması ve çalışanı **Cem Deniz DEMİR'e**, Adana Numune Gastroenteroloji klinik şefi **Doç. Dr. Ümit Bilge DOĞAN'a**, Adana Dr. Aşkın Tüfekçi Devlet Hastanesi Gastroenteroloji klinik sorumlusu **Dr. Bahri ABAYLI**, çok sevgili kıdemli **Dr. Salih IŞIK**, Gastroenteroloji servisi sorumlu hemşiresi **İlknur ARSLAN'a**,

Müthiş tertipli, düzenli ve hızlı çalışan Pediatrik onkoloji laboratuvarı çalışanları Hemşire **Nebahat ÖZ**, Hemşire **Ayçin ARKAN'a**, malzeme ve teknik destekte bana yardımcı olan Biyolog **Dr. Mehmet KURUL**, Biyolog Dr. **Yasemin TÜCCAR**, **Ufuk AKSOY'a**, moleküler biyoloji ve genetik konusunda bitmek bilmez sorularıyla gece gündüz bunalttığım, her soruma özenle yanıt veren çok sevdiğim arkadaşım Moleküler Biyolog **Dr. Metehan ÇİFDALÖZ'e**, laboratuvarında birlikte müthiş bir disiplinle çalışmaktan gurur duyduğum, asla yorulmayan ve bilime pozitif bakmayı başarabilen Biyolog **Onur UÇAR'a**, hasta bulmamda bana en büyük desteği sağlayan, kendi çalışmasını yürütürcesine büyük bir özenle çalışan **Dr. Agah Bahadır ÖZTÜRK'e**, yardım istediğim her konuda benden desteğini esirgemeyen, canımdan çok sevdiğim **BABAM** için verdiğimiz mücadelede hep yanımızda olan **Prof. Dr. Semra PAYDAŞ'a**,

Yorulduğum her an bana destek olan, hayat yolunda beraber yürümekten gurur ve onur duyacağım müstakbel eşim **Dr. Elvan UYGUR'a**, kardeşlerim **Dr. Bilen ONAN** ve **Ecz. Deniz ONAN'a**, bana insanlığı, saflığı, dürüstlüğü öğreten **ANNEM**, **Hatice ONAN'a** ve çocukluğumdan beri izinden yürüdüğüm, bana samimiyeti, disiplini, çalışkanlığı, doğru bildiğim yolda inatla yürüyüp hür kararlar verebilmeyi, düşüp yeniden kalkabilmeyi, asla yılmamayı öğreten **BABAM**, **merhum Dr. Abidin ONAN'a**

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNUYORUM...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	III
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
ÖZET ve ANAHTAR KELİMELELER	X
ABSTRACT and KEY WORDS	XI
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hepatoselüler Kanser Epidemiyolojisi.....	3
2.1.1. Hepatit B enfeksiyonunda Hepatoselüler Karsinom Riski	5
2.1.2. Hepatit B Virüsü Bulaşı ve Replikasyonu	6
2.1.3. Hepatit B Virüsü Genotipleri	7
2.1.4. Okült Hepatit B Enfeksiyonu	7
2.1.5. Hepatit C Virüsü Enfeksiyonunda Hepatoselüler Karsinom Riski	8
2.1.6. Hepatit C Virüsü ile İlişkili Viral Faktörler	8
2.1.7. İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü ve Hepatoselüler Karsinom Riski.....	8
2.1.8. Kahve İçimi ve Hepatoselüler Karsinom	9
2.1.9. Cinsiyet ve Hepatoselüler Karsinom.....	9
2.1.10. Hepatit B ve Hepatit C Virüsü Koenfeksiyonu.....	10
2.1.11. Alkol ve Hepatoselüler Karsinom.....	10
2.1.12. Tütün Kullanımı ve Hepatoselüler Karsinom	10
2.1.13. Aflatoksin B ₁ ve Hepatoselüler Karsinom	10
2.1.14. Metabolik Sendrom ve Hepatoselüler Karsinom	11
2.1.15. Konağın Genetik Faktörleri ve Hepatoselüler Karsinom.....	11
2.1.16. Tümör Nekrozis Faktör- α Varyantları ve Hepatoselüler Karsinom	11
2.1.17. Glutathione S-Transferase Varyantları ve Hepatoselüler Karsinom.....	12
2.2. Hepatoselüler Kanserın Klinik Özellikleri.....	12
2.3. Hepatoselüler Karsinoma'da İzlem.....	13
2.4. Hepatoselüler Karsinomada Tanısal Amaçlı Görüntüleme.....	14

2.5. Hepatoselüler Karsinoma'ya Tanısal Yaklaşım.....	14
2.6. Hepatoselüler Karsinom Tedavisi	15
2.6.1. Küratif Tedavi Yöntemleri.....	16
2.6.1.1. Cerrahi Rezeksiyon.....	16
2.6.1.2. Karaciğer Transplantasyonu	17
2.6.1.3. Perkütan Ablasyon Tedavileri	18
2.6.2. Non-Küratif (Palyatif) Tedavi Yöntemleri	19
2.6.2.1. Trans-Arteriyel Embolizasyon-Kemoembolizasyon	19
2.6.2.2. Sorafenib.....	20
3. KANSER VE MİKRO-RNA	23
3.1. MicroRNA Biyogenezi	24
3.2. Tümör Süpresör/Onkogen miRNAlar	25
3.3. Karaciğer Hastalıklarında miRNA'ların Yeri	26
3.3.1. Viral Hepatitlerde miRNA'ların Rolü.....	27
3.3.2. Alkolik ve Nonalkolik Karaciğer Hastalığında miRNA'ların Rolü.....	27
3.3.3. Fibrozis ve miRNAlar	28
3.4. Hepatoselüler Karsinom ve miRNAlar	28
3.5. Microna 122 (miR-122)	29
3.6. Hepatoselüler Kanser ve miR-122	32
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
4.1. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkimesi	34
4.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları	38
4.2.1. Universal Komplementer DNA Sentez Kiti.....	38
4.2.2. Komplementer DNA Yapımı İçin Karışım Protokolü	39
4.2.3. Komplementer DNA Yapımı İçin Isı Protokolü	39
4.2.4. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Housekeeping gen/ Referans gen)	40
4.2.5. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Target gen/Hedef gen).....	40
4.2.6. Gerçek Zamanlı PCR Isı Protokolü	40
4.3. İstatistiksel Metod	41
5. BULGULAR.....	43
6. TARTIŞMA	54

7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	75

TABLULAR LİSTESİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1. Hepatoselüler Karsinom İzlemi Önerilen Hasta Grubu.....	13
Tablo 2. Komplementer DNA Yapımı İçin Karışım Protokolü	39
Tablo 3. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Housekeeping gen/ Referans gen)	40
Tablo 4. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Target gen/Hedef gen)	40
Tablo 5. Gerçek Zamanlı PCR Isı Protokolü	41
Tablo 6. Hasta ve Kontrol Grubu Karşılaştırması	43
Tablo 7. Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Dağılımı	44
Tablo 8. Hasta Grubunun Tanımlayıcı İstatistikleri	45
Tablo 9. Hasta Grubunun Tümör Boyutu, MELD Skoru, Bilurubin ve AFP Değerleri.....	45
Tablo 10. Hasta ve Kontrol Grubunun Laboratuvar Verileri ve Serum miR-122 Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	46
Tablo 11. miR-122 İçin Cut-Off Değer Seçimi	47
Tablo 12. Spearman Korelasyon Tablosu.....	48
Tablo 13. Serum miR-122 Düzeyinin Hastaların Demografik Verileri ile İlişkisi	49
Tablo 14. Karaciğer Nakli Öncesi ve Sonrası Serum miR-122 Düzeyleri.....	50
Tablo 15. Hepatit B Enfeksiyonu Olan ve Non-Viral Örneklerin Serum miR-122 Düzeyi İlişkisi... ..	50
Tablo 16. Hepatit C Enfeksiyonu Olan ve Non-Viral Örneklerin Serum miR-122 Düzeyi İlişkisi ..	51
Tablo 17. Viral Hepatiti Olan ve Olmayanlar Arasındaki Serum miR-122 Düzeyi İlişkisi	51
Tablo 18. Serum miR-122 Düzeyi -HBV DNA Düzeyi İlişkisi	52
Tablo 19. Serum miR-122 Düzeyi – HbsAg Kantitasyonu İlişkisi.....	52
Tablo 20. Serum miR-122 Düzeyi – Alanin Aminotransferaz (ALT) İlişkisi	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. HCC'nin yaşa göre düzeltilmiş mortalite oranlarının bölgesel dağılımı.....	3
Şekil 2. Dünyanın farklı bölgelerinde karaciğer kanserinin yaş standardize kadın/erkek 100.000 yaşam yılı insidans oranı (GLOBOCAN)	4
Şekil 3. Farklı coğrafi bölgelerde HBsAg taşıyıcısı ve kronik HCV prevalansı ²⁰	5
Şekil 4. BCLC hepatoselüler karsinom tanı ve tedavi algoritması.....	21
Şekil 5. Kanser ve MicroRNA'larla ilgili yapılan çalışmalar	23
Şekil 6. MicroRNA biyogenezi	25
Şekil 7. Tümör süpresör/Onkogen miRNAlar	26
Şekil 8. miRNAların kronik karaciğer hastalığı patogenezi ve kanserdeki rolleri	27
Şekil 9.A. pri-miR-122'nin yapısı ve transkripsiyonel düzenlenme.....	30
Şekil 10.B ve C: pre-miR-122 sekansı ve matür 23 nükleotidli miR-122 (eflatun renkte), matür miR-122 formları	31
Şekil 11. Hayali bir RT-PCR sonucu grafiği. A, B ve C örneklerinin C _T değerleri gösterilmiştir ..	36
Şekil 12. RT-PCR sonucunun görece değerlendirmesi için kullanılan formül	37
Şekil 13. Hasta ve kontrollere ait amplifikasyon eğrileri.....	41
Şekil 14. ROC eğrisi altında kalan alan (AUC) 0,724 p=0,0001	47

KISALTMALAR LİSTESİ

HSK	: Hepatoselüler Karsinom
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCV	: Hepatit C Virüsü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik Asit
MiRNA	: MicroRNA
HBsAg	: Hepatit B yüzey antijeni
HIV	: Human immun deficiency virüs, insan immün yetmezlik virüsü
HDV	: Hepatit D virüsü
HBeAg	: Hepatit B envelope(zarf) antijeni
AntiHBcIgG	: Hepatit B'nin core antijenine karşı gelişmiş antikor
AntiHBs	: Hepatit B'nin surface(yüzey) antijenine karşı gelişmiş antikor
AFP	: Alfa-fetoprotein
ALT	: Alanin aminotransferaz
GGT	: Gama-glutamil transpeptidaz
Tip 2 DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-alfa
GST	: Glutasyon S-transferaz
USG	: Ultrasound görüntüleme
BT	: Bilgisayarlı tomografi
MRI	: Magnetik rezonans imaging(görüntüleme)
AASLD	: American association for the study of liver diseases
RFA	: Radyofrekans ablasyon
TAE	: Transarteryel embolizasyon
TAKE	: Transarteryel kemoembolizasyon
BCLC	: Barcelona Clinic Liver Cancer
mRNA	: Messenger (ulak) RNA
ORF	: opening reading frame,(açık okuma çerçevesi)
ALD	: Alcoholic liver disease, Alkolik karaciğer hastalığı
NAFLD	: Nonalcoholic fatty liver disease, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı

TGF-β	: Transforming growth faktör β
CPEP	: cytoplasmic polyadenilation element binding protein
RT-PCR	: Real time PCR, gerçek zamanlı polimeraz zincirleme tepkimesi
cDNA	: Complementary DNA, Total RNA'dan revers transkriptaz enzimi ile sentezlenen DNA
PTZ	: Protrombin zamanı
INR	: İnternational normalized ratio,
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
CRP	: C-reaktif protein

ÖZET

Hepatoselüler Karsinomada miR-122'nin Yeri ve Önemi

Giriş ve Amaç: Hepatoselüler karsinomanın erken evrede saptanması prognoz ve hasta yönetimi açısından çok önemlidir. Hepatoselüler karsinomu erken aşamada tespit edecek ideal bir marker henüz yoktur. MicroRNA-122, Hepatoselüler karsinoma'da anlamlı olabilecek yeni bir biyomarker olabilir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Balcalı Hastanesinde 2011-2012 yıllarında tedavi gören 43 hepatoselüler karsinoma hastasının ve 43 sağlıklı kontrol grubunun serumunda real time-PCR metodu kullanılarak microRNA-122 düzeyleri saptandı.

Bulgular: Hepatoselüler karsinomalı hasta grubunun serum miR-122 değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu.(hasta grubu ort.: $0,030173 \pm 0,053$, kontrol grubu ort.: $0,00493 \pm 0,015$, $p < 0.0001$) ROC eğrisi altında kalan alana göre (0,724) hasta grubunda miR-122 için cut-off değeri belirlendi. Ayrıca hastaların miR-122 değerleri, Hepatoselüler karsinoma'da anlamlı olan diğer diagnostik, klinik, prognostik verilerle karşılaştırıldı.

Sonuç: Çalışmamızda farklı kliniklerde takip edilen farklı evrelerdeki hepatoselüler karsinoma hastalarının serumunda real-time PCR metodu ile miR-122'yi gösterdik ve bu değerleri hastaların diğer diagnostik, klinik, prognostik verileriyle karşılaştırdık. MicroRNA'ların yakın dönemde yeni ve iyi biyomarkerlar olarak rutin kullanıma geçeceği düşünülmektedir. Şu dönemde hastanın serum miR-122 değeri viral hepatit, hepatoselüler karsinom, karaciğer tümör rezeksiyonu ya da karaciğer transplantı gibi durumlarda tedavi öncesi ve sonrası, ameliyat öncesi ve sonrasında bakılan kontrollerle karaciğerdeki nekroinflamasyonun giderildiğinin ciddi bir göstergesi olabilir. Ancak miR-122 tek başına hepatoselüler karsinomada tanı, prognoz ve surveyansı göstermede iyi bir biyomarker olmayabilir. Diğer tanısal, klinik, prognostik göstergelerle birlikte kullanılması daha anlamlı olabilir.

Anahtar Sözcükler: Hepatoselüler, Karsinom, microRNA-122.

ABSTRACT

The Importance of miR-122 in Patients With Hepatocellular Carcinoma

Introduction and Objective: It is very important to determine hepatocellular carcinoma at an early stage for prognosis and patient management. There is still no ideal marker to detect hepatocellular carcinoma at early stage. MicroRNA-122 may be a novel biomarker for hepatocellular carcinoma.

Materials and methods: This study was performed in 2011-2012 at Cukurova University, Faculty of Medicine, Balcalı Hospital with 43 hepatocellular carcinoma and 43 control patients. The peripheral blood was collected from patients and controls. MicroRNA-122 levels were determined by using real-time-PCR method.

Results: Serum miR-122 amount in hepatocellular carcinoma group was significantly higher than the level found in the control group. ($0.030173 \pm 0.053 > 0.00493 \pm 0.015$, $p < 0.0001$). According to the area under the ROC curve (0.724) the patient group were identified for the cut-off value of miR-122. In addition, patient's other diagnostic, clinical and prognostic data were compared with miR-122 levels.

Conclusion: In our study we showed amounts of circulating miR-122 in different clinical stages of hepatocellular carcinoma in patient's serum with real time-PCR method, also we compared patient's circulating miR-122 with other diagnostic, prognostic and clinical values. MicroRNA's are thought to be novel serum biomarkers in cancer diagnosis, prognosis and follow-up. To become a novel biomarker, miR-122 needs large-scale studies. In this period the value of the patient's own serum miR-122 can be used in the situations of viral hepatitis, hepatocellular carcinoma, liver tumour resection or liver transplant before and after these procedures. But serum miR-122 alone may not be a good biomarker to show diagnosis, prognosis and surveillance of hepatocellular carcinoma. To use other diagnostic, clinical, prognostic indicators in conjunction with miR-122 may be more meaningful.

Key Words: Hepatocellular carcinoma, microRNA-122.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Primer karaciğer kanseri tüm dünyada 5. en sık gözlenen kanser olup, en yaygın görülen kanserler arasında mortalitede üçüncü sıradadır¹. Hepatosellüler kanser (HSK) primer karaciğer kanserlerinin % 85-90'lık bir kısmını oluşturmaktadır².

HSK olgularının büyük çoğunluğu (% 80) sahra altı Afrika veya doğu Asya'da bulunmaktadır. Ülkeler arasında olguların büyük çoğunluğu Çin kaynaklıdır. (erkeklerde 35,2/100.000, kadınlarda 13,3/100.000)³.

ABD(Amerika Birleşik Devletleri)' de agresif konvansiyonel tedavilere rağmen 5 yıllık sağ kalımı % 8,9 olup, pankreatik duktal adenokanserden sonra (5 yıllık sağkalım % 4,4) en lethal kanserdir⁴. Varolan antikanser ajanlara olan direnci, çıkarılabilir cerrahi sınırlarda iken kitleyi gösterebilecek güvenilir bir biyomarkerin olmaması, altta yatan karaciğer hastalığı nedeniyle etkin dozda kemoterapötik ilaç verilememesi hastalığı lethal kanserler arasına koymaktadır⁵.

HSK ile ilgili bilinen en belirgin faktörler hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), kronik alkol kullanımı, aflatoksinle kontamine olmuş gıda alımıdır. P53 gen inaktivasyonu, β -katenin mutasyonu, ErbB reseptör ailesinin overekspresyonu, MET reseptörlerinin overekspresyonu gibi birçok genetik olay HSK gelişimi ile ilişkilidir.

Genomik instabilite HSK gelişiminin önemli bir basamağıdır. Buna telomer erozyonu, kromozom ayırım defektleri, DNA (deoksiribonükleik asit) hasar tamir mekanizmalarının bozukluğu gibi birçok farklı mekanizma eşlik eder.

HSK'da gen ekspresyon analizlerinin yapılmasıyla HSK'nın prognoz, etyoloji ve intrahepatik rekürrensini ortaya koymada başarı sağlanmıştır.

HSK'nın genomik instabilite yolağını, konak-virüs ilişkisini, mikroçevre proseslerini (inflamasyon, siroz), hepatokarsinogenezdeki hücre orjinini daha iyi anlamak ve HSK gelişim riski yüksek kişileri biyomarkerlerle erken hastalık evresinde tanımlayabilmek için birçok çalışma yapılmıştır ve daha yeni birçok çalışmaya ihtiyaç vardır⁶.

Kanser esas olarak kontrolsüz proliferasyon ve hasarlı hücrelerin hayatta kalması ile sonuçlanan bir süreçtir. Hücreler düzgün bölünme, farklılaşma ve ölüm aşamasında birçok kontrol mekanizmasına sahiptir. Birçok regülatuar faktör bu aşamalarda genleri

aktive ya da inaktive ederek bölünme, farklılaşma ve kontrollü hücre ölümünü programlamaktadır. Bu genlerin (tümör süpresör gen ve onkogen) hasarlanması kanserle sonuçlanır. Birçok tümör süpresör gen ya da onkogen etkilerini göstermek için önce ilgili genin DNA'sından RNA (Ribonükleik asit) elde edip ilgili proteini sentezleterek etki göstermektedir. Yeni çalışmalarda küçük, protein kodlu olmayan RNA moleküllerinin de 'microRNA, miRNA' tümör süpresör gen ya da onkogen gibi aktivite gösterdiği gösterilmiştir⁷.

MicroRNA'lar hayvanlar ve bitkilerde yeni tanımlanmış, selüler proliferasyon, farklılaşma ve apoptoziste geniş biyolojik etkileri olan, protein kodlu olmayan, tek zincirli, 20-22 nükleotidli bir dizi negatif gen regülatörüdür. İnsan genomunda şu ana kadar tanımlanmış 1800'e yakın microRNA mevcuttur.(www.mirbase.org) Tüm genlerin içerisinde % 1-4 lük bir yer kapladığı için microRNAlar gen regülatörlerinin içerisindeki büyük gruplardan birisidir⁸.

MicroRNA 122, karaciğere spesifik ve karaciğerde en çok bulunan miRNA'dır. Hepatosit büyümesi, diferansiasyonu, kolesterol metabolizması ve stres yanıtında önemli role sahiptir^{9,10}. Erişkin karaciğerinde hepatosit başına yaklaşık 66.000 kopya miR-122 bulunmaktadır¹¹. Aynı zamanda birçok karaciğer hastalığı ile ilişkilidir. HCV enfeksiyonunda majör pozitif rolü varken, HSK'da negatif bir role sahiptir^{12,13}. HSK'da farklı birçok hedef moleküle bağlanarak hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz ve anjiogenez üzerinde tümör süpresör etkinlik göstermektedir. Esas olarak Wnt/ β -catenin yolağını kullanarak antikanser etkinliğini göstermektedir¹⁴⁻¹⁷. Ancak miR-122'nin hepatokarsinogenezdeki moleküler mekanizması halen net olarak açıklanamamıştır.

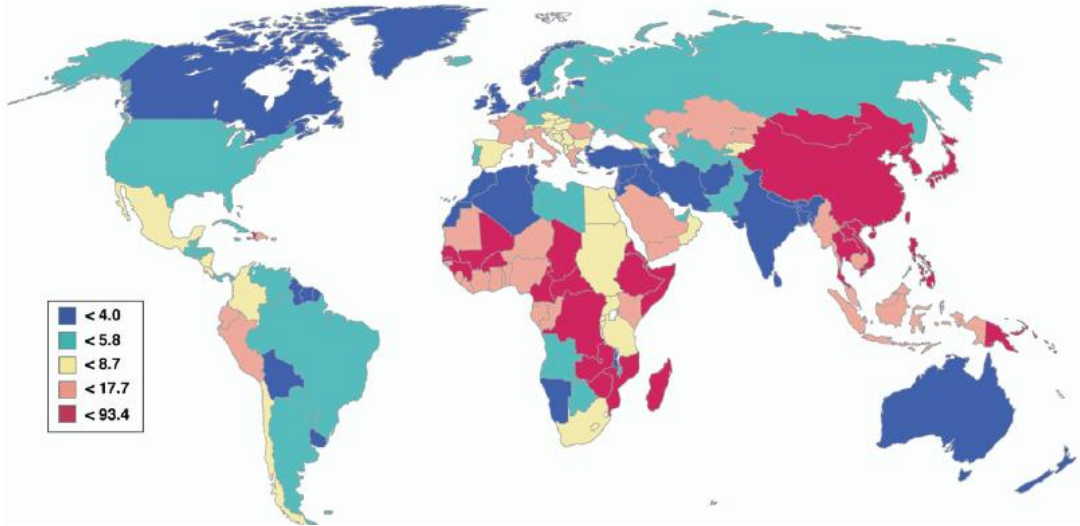
Tümöral dokuda düzeyi azalan miR-122'nin karaciğerdeki hasara bağlı olarak serum ya da plazmada artacağı düşünülmektedir. Ve bu yüzden hepatoselüler kanserde miR-122'nin yeni bir kanser tanı, tedavi ve prognoz markerı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, farklı kliniklerde takip edilen farklı evrelerdeki 43 hepatoselüler kanserli hastanın kanında real-time PCR metodu ile miR-122'yi göstermeyi ve bu değerleri hastaların diğer diagnostik, klinik, prognostik verileriyle karşılaştırmayı hedefledik.

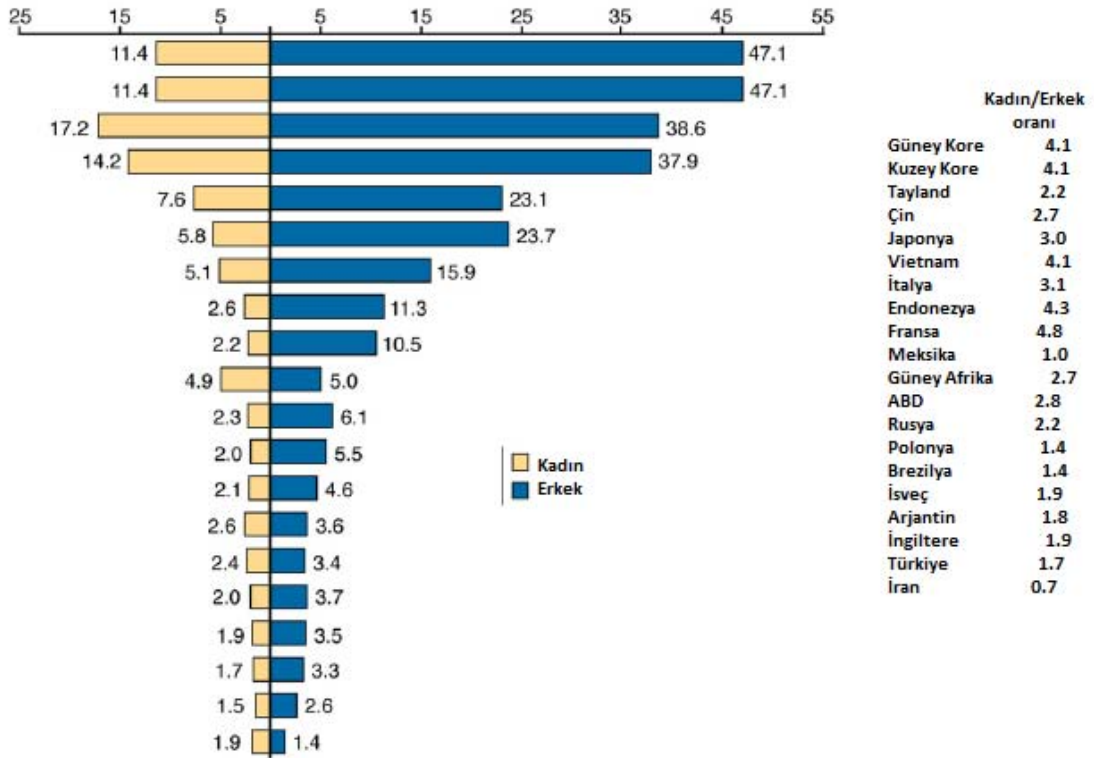
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatoselüler Kanser Epidemiyolojisi

Primer karaciğer kanseri tüm dünyada 5. en sık gözlenen kanser olup, en yaygın görülen kanserler arasında mortalitede üçüncü sıradadır¹. Hepatoselüler kanser primer karaciğer kanserlerinin % 85- 90'lık bir kısmını oluşturmaktadır². HSK olgularının büyük çoğunluğu (% 80) sahra altı Afrika veya Doğu Asya'da bulunmaktadır. (20/100.000) Güney Avrupa ülkelerinde (İspanya, İtalya ve Yunanistan) insidans 10-20/100.000 iken Kuzey Amerika, Güney Amerika, Kuzey Avrupa'da insidans <5/100.000 dir¹⁵. (Şekil 1)



Şekil 1. HCC'nin yaşa göre düzeltilmiş mortalite oranlarının bölgesel dağılımı

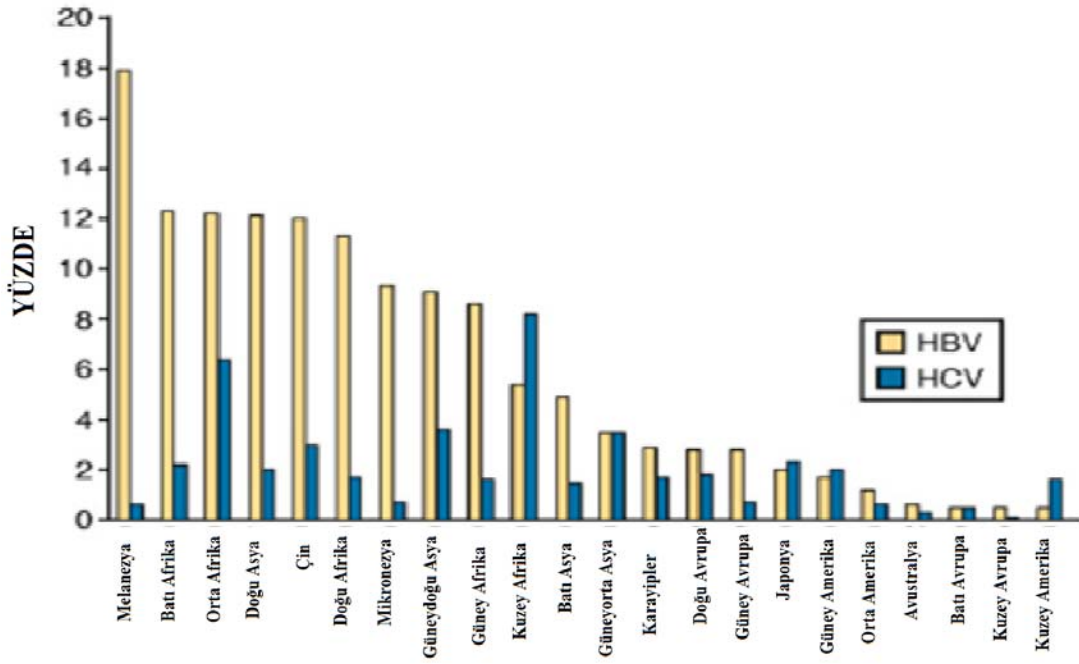


Şekil 2. Dünyanın farklı bölgelerinde karaciğer kanserinin yaş standardize kadın/erkek 100.000 yaşam yılı insidans oranı (GLOBOCAN)

HSK, HBV'nin endemik olduğu yerler dışında ilk 4 dekatta nadiren görülür. Çin'de ortalama HSK yaşı 55-59 iken, Avrupa ve Kuzey Amerika'da 63-65'tir. Hastalık riski düşük populasyonlarda ortalama yaş 75 ve üzeridir. (Şekil 2)

HSK'lı hastaların % 80-90'a yakınında siroz vardır. HBV ve HCV esas olarak sirozu artırarak HSK insidansını artırır. Sirozlu bir hastada etyolojiye, bölge ve etnisiteye (en yüksek oranda Asyalılarda), sirozun evresine (en sık dekompanse evrede) göre değişmekle birlikte 5 yıl içerisindeki kümülatif HSK gelişme riski % 5-30'dur¹⁸.

Dünya nüfusunun yaklaşık % 5'i (350-400 milyon insan), HBV ile kronik olarak enfektedir (Asyalılar bu grubun % 75'i iken, batı ülkelerde prevalans düşüktür.)¹⁹. Dünya çapında HBV prevalansı ve HSK insidansı, mortalitesi arasında kuvvetli bir ekolojik korelasyon mevcuttur. (Şekil 3)



Şekil 3. Farklı coğrafi bölgelerde HBsAg taşıyıcısı ve kronik HCV prevalansı²⁰

HSK insidansının yüksek olduğu Asya ve sahra altı Afrika’da kronik HBV enfeksiyonu tüm vakaların yaklaşık olarak % 50’si, çocukluk çağı HSK’larının neredeyse tamamı iken, istisnai olarak Japonya’da HSK için majör risk faktörü HCV’dir. HSK’lı hastalar arasında Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) seroprevalansı İsveçte % 3, ABD’de % 10, Japonyada % 10-15, İtalya’da % 19, Yunanistan’da % 55 ve Güney Kore’de % 70’tir.

% 90’ın üzerinde ülkede yenidoğanlar HBV’ye karşı aşılansın ve yaklaşık % 70’i 3 immünizasyon dozu uygulamaktadır. Bu uygulamadan sonra çocuk popülasyondaki HBV taşıyıcısı oranı büyük oranda azalmıştır ve 6-14 yaş aralığındaki çocuklarda insidans % 65-75 oranında azalmıştır²¹.

2.1.1. Hepatit B enfeksiyonunda Hepatoselüler Karsinom Riski

Prospektif kohort çalışmalarda HSK gelişme riski kronik HBV’li hastalarda 5-100 kat artmış olarak bulunmuştur. Vaka kontrollü ve çapraz kesitli çalışmaların meta-analizlerinde HBsAg pozitif bireylerin yaşam boyu HSK riski, HBsAg negatif bireylere göre 20 kat artmış olarak bulunmuştur²².

Birçok HBV enfeksiyonu geçiren hastanın HSK'sı kronik nekroinflamasyona sekonder siroza bağlı gelişmektedir. Ancak HBV'li hastalarda siroz yokluğunda da HSK gelişebilmektedir. (% 10-30)²³

HBV taşıyıcılarında HSK riskini artıran durumlar arasında;

- Demografik (erkek cinsiyet, ileri yaş, Asya ya da Afrika kökeni, ailede HSK öyküsü)
- Viral (yüksek düzeyde HBV replikasyonu, HBV genotipi, uzun süreli enfeksiyon, HCV ile koinfeksiyon, HIV, HDV)
- Klinik (siroz)
- Çevresel faktörler (aflatoksin maruziyeti, alkol ve tütün kullanımı) vardır.

2.1.2. Hepatit B Virüsü Bulaşı ve Replikasyonu

Başta Asya olmak üzere birçok yüksek riskli bölgede HBV vertikal yolla (anneden bebeğe) bulaşmaktadır ve enfekte bebeklerde % 90 oranında kronik enfeksiyon gelişmektedir. HSK'nın düşük insidanslı olduğu bölgelerde HBV enfeksiyonu genel olarak erişkin çağda geçirilmektedir ve seksüel ya da horizontal yolla (parenteral yol) bulaşmaktadır. Akut HBV enfeksiyonlarının % 90'a yakını spontan olarak iyileşmektedir. HBV enfeksiyonunun yaygın olduğu bölgelerdeki kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda HSK gelişme riski daha yüksektir.

Yüksek düzeyde HBV replikasyonu olan hastalarda (HBeAg ve HBV DNA düzeyi ile saptanmakta) HSK riski artmıştır. HBV replikasyonunun HSK riski üzerine yapılmış 11,893 Tayvan'lı hastanın katıldığı bir araştırmada hastalar 8.5 yıla kadar izlenmiş. HSK insidansı;

- HBsAg(+) ve HBeAg(+) hastalarda 1.169/100.000
- HBsAg(+) ve HBeAg(-) hastalarda 324/100.000
- HBsAg(-) ve HBeAg(-) hastalarda 39/100.000 olarak saptanmıştır. Buna eşdeğer olarak HBeAg(+) grubun relativ HSK riski 60 kat iken, HBsAg(+) grubun relativ HCC riski 10 kat artmış olarak bulunmuştur²⁴.

HBV DNA düzeyi ve HSK artmış insidansını göstermek amacıyla Chen ve ark.nın²⁵ yaptığı çalışmada inaktif HBV taşıyıcılarının (HBeAg(-) ve serum HBV DNA<10.000 kopya/mL ve normal transaminaz düzeyleri) HSK riski, HBsAg(-) olanlara göre 5 kat daha yüksek bulunmuştur.

Viral replikasyon düzeyleri antiviral tedaviden etkilenmektedir. HBV enfeksiyonu olan HBsAg(+) hastalarda efektif antiviral tedavinin HSK riskini belirgin olarak azalttığı ancak yok etmediğine dair kuvvetli kanıtlar mevcuttur. Liaw ve ark.nın²⁶ yaptığı geniş Asya kökenli çalışmada 5 yıl süre ile kronik HBV ve sirozu olan ya da ileri evre fibrozisi olan hastalara 100 mg lamivudin tedavisi ve plasebo verilmiş. Plasebo verilen grupta HSK % 7,4 gelişirken, lamivudine alan grupta % 3,9 HSK geliştiği gözlenmiştir.

2.1.3. Hepatit B Virüsü Genotipleri

Birçok HBV genotipi tanımlanmış olup (A-H), bu genotipler farklı coğrafyalara ve etnik kökenlere dağılmıştır. Genotip A ve D daha çok Afrika, Avrupa ve Hindistan'da bulunurken, B ve C daha çok Asya'da, Genotip E batı Afrika'da, Genotip F ise güney ve orta Amerika'da bulunmaktadır. ABD'de HBV genotip A ve D daha çok Afroamerikanlarda sık iken, B ve C daha çok Asya kökenlilerde siktir.

HBV genotipleri farklı klinik sonuçlara neden olabilmektedir. Örneğin Asya'da yapılan bir çalışmada HBV genotip C enfeksiyonunun genotip B'ye göre daha fazla karaciğer hastalığı, siroz ve hepatoselüler kansere yol açtığı gözlenirken, Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da HBV genotip D ile enfekte olan bireylerin genotip A ile enfekte olanlara göre yaygın karaciğer hastalığı ve hepatoselüler kanser insidansının daha fazla olduğu gözlenmiştir.

2.1.4. Okült Hepatit B Enfeksiyonu

Çalışmalarda hepatit B enfeksiyonu sonrası serolojik düzelmenin olduğu hastalarda (HBsAg(-) ve AntiHBc IgG(+) ve/veya AntiHBs(+)) HBV DNA'nın serumda ya da karaciğer dokusunda sebat ettiği gözlenmiştir.

Okült HBV ile HSK riskini inceleyen 16 çalışmanın 6 sında okült HBV'nin HSK riskini artırmadığı görülmüştür. 3 ü Japonya'dan olan 4 longitudinal çalışmada okült HBV'nin ılımlı düzeyde HSK riskini artırdığı gözlenmiştir²⁷. Hong Kong'da yapılan vaka kontrollü çalışmada kriptojenik HSK'nın okült HBV enfeksiyonu geçiren hastalarda arttığı gözlenmiştir²⁸.

Ancak okült HBV'nin HSK için bağımsız bir risk faktörü olduğunu gösteren yeterli kanıt düzeyinde veri yoktur.

2.1.5. Hepatit C Virüsü Enfeksiyonunda Hepatoselüler Karsinom Riski

HCV enfeksiyonunun HSK ile sonuçlandığını gösteren çok fazla kanıt vardır. HCV enfeksiyonu olan kohortlarla olmayanların karşılaştırıldığı prospektif çalışmalarda HCV enfeksiyonu olanlarda HSK riskinin belirgin olarak arttığı gözlenmiştir²⁹. HCV ile enfekte kişilerde 30 hasta yılı içerisinde HSK gelişme riski % 1-3 arasında değişmektedir. HCV fibrozisi ve sirozu arttırarak HSK riskini arttırmaktadır. HCV ile enfekte kişilerde düşük trombosit sayısı ve AFP'nin (alfa-fetoprotein) yüksek düzeyleri de HSK için artmış risk faktörüdür.

2.1.6. Hepatit C Virüsü ile İlişkili Viral Faktörler

Hangi düzeyde olursa olsun HCV viremi HSK için kuvvetli bir risk faktörüdür ve tedavi virüsü elimine ederek riski azaltır. Randomize kontrollü ve birçok nonrandomize çalışmada, sirozu olan ya da olmayan HCV enfekte hastaların interferon tedavisine kalıcı virolojik yanıt vermesi ile HSK riski, % 57 - % 75 arasında azalmaktadır.

HCV'nin genomunda % 30-35 nükleotide kadar farklılık gösteren 6 genotipi mevcuttur. Aynı zamanda farklı subtipleri de mevcuttur. Genotip 1a ve 1b daha çok ABD'de ve Avrupa'da yaygınken, Japonya'da HCV taşıyan hastaların % 73'ünün genotip 1 b ile enfekte olduğu gösterilmiştir. HCV genotipi ve HSK riski arasındaki bildiriler uyumsuzdur. Ancak yapılan 21 çalışmalı metaanalizde HCV genotip 1b ile enfekte hastaların, HCV'nin diğer genotipleriyle enfekte olan hastalarına göre HSK riski yaklaşık 2 kat artmış olarak bulunmuştur.

HCV'nin diğer viral faktörlerinin HSK riskini artırdığına ya da HSK'ya progresyonu hızlandırdığına dair kanıt düzeyinde veri yoktur. Taiwan'da yapılan bir çalışmada HCV viremi düzeyi ile HSK riski arasında bir korelasyon bulunmuş³⁰; ancak ABD ve Avrupa'nın çalışmaları bu ilişkiyi gösterememiştir.

2.1.7. İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü ve Hepatoselüler Karsinom Riski

Birçok çalışma HIV (İnsan immün yetmezlik virüsü) enfeksiyonunun HCV ile birlikteliğinde karaciğer hastalığının, fibrozis, siroz, dekompanse karaciğer hastalığı ve HSK'ya ilerlediğini göstermektedir. Bu çalışmalar genel olarak retrospektif ve çapraz kesitli çalışmalardır. Ancak çalışmaların limitli olmasına rağmen özellikle

immünoşüpresif dönemdeki HIV koenfeksiyonunun siroza, dekompanse karaciğer hastalığına progresyonunun daha hızlı olduğu bilinmektedir. HIV koenfeksiyonu olan ve akselere karaciğer hastalığı olan hastalarda verilen antiretroviral tedavinin HSK riskini azaltabileceği gösterilmiştir³¹.

HIV'le enfekte kişilerde HBV enfeksiyonu % 25 iken, HIV'le enfekte olmayanlarda bu oran % 5'tir. HBV ve HIV koenfeksiyonu olan hastaların karaciğer hastalığı ilişkili mortalitesi artmıştır. Ancak HBV ve HIV koenfeksiyonunun HSK'ya progresyonu artırdığına dair çok az veri mevcuttur.

2.1.8. Kahve İçimi ve Hepatoselüler Karsinom

Toplum kökenli çalışmalarda günde 2 bardağın üzerinde kahve içiminin ALT (alanin aminotransferaz) ve GGT (gamaglutamil transpeptidaz) düzeyini azalttığı ve kronik karaciğer hastalığı insidansını azalttığı gösterilmiştir. Kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda kafein düzeyi yüksekliğinin daha ılımlı fibrozis ile ilişkisi bulunmuştur³².

Konu ile ilgili yapılmış birçok çalışmada kahve içimi ile HSK riski arasında ters bir ilişki bulunmuştur. 10 çalışmalı bir metaanalizde (Avrupa ve Japonya'dan 6 vaka kontrollü çalışma ve Japonya'dan 4 kohort çalışması) kahve içenlerde HSK riski içmeyenlere göre daha düşük bulunmuştur^{33,34}. Kafeinin hangi mekanizma ile karaciğer hastalığı riskini azalttığı net olarak bilinmese de siroz riskini azalttığı ve içerisindeki 'cafestol' ve 'ditrepen' maddelerin detoksifikasyonda rol oynadığı düşünülmektedir. Aynı zamanda kahve içiminin insülin düzeylerini düşürerek tip 2 DM (Tip 2 diyabetes mellitus) gelişimini azalttığı, dolayısıyla karaciğeri bununla ilgili yağlı karaciğer hastalığı, siroz ve HSK'dan koruduğu düşünülebilir³⁵.

2.1.9. Cinsiyet ve Hepatoselüler Karsinom

Erkek cinsiyette viral hepatit ve alkolik siroz daha fazla olduğundan HSK riski artmıştır. Taiwan ve Shanghai'den yapılan vaka kontrollü çalışmalarda yüksek serum testosteron düzeyleri HSK riski ile ilişkili bulunmuştur³⁶. Transgenik farelerle yapılan çalışmalarda androjen yolağının HBV gen replikasyonunu artırdığı, androjenlerin direk olarak viral genoma bağlandığı diğer taraftan HBV proteini olan HBx in androjen reseptörlerinin transkripsiyonunu artırdığı gözlenmiştir^{37,38}.

2.1.10. Hepatit B ve Hepatit C Virüsü Koenfeksiyonu

HBV ve HCV koenfeksiyonunun HSK riskini daha fazla arttırdığını gösteren çok büyük bir çalışma yoktur ancak 1998 ve 2005 yıllarında yapılan 2 meta-analizde HBV ve HCV koenfeksiyonunda HSK gelişme riskinin, yalnızca HBV veya yalnızca HCV enfeksiyonuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur^{39,40}. Cho LY ve ark.'nın 2000-2009 yılları arasındaki çalışmalardan oluşturduğu metaanaliz, HBV ve HCV koenfeksiyonunun HSK gelişiminde ilave risk oluşturmadığını göstermektedir⁴¹. HBV ve HCV koenfeksiyonunun HSK gelişiminde ilave risk olmaması, bir virüsün enfeksiyonu sırasında diğerini baskılaması söz konusu olduğundan, daha muhtemeldir.

2.1.11. Alkol ve Hepatoselüler Karsinom

HCV ve ağır düzeyde alkol alımının (günlük 60 gram üzeri), daha az olarak da HBV ve alkol alımının sirozu arttırmada sinerjistik etkileştiği bilinmektedir. 1995 ve 2004 arası yayınlanan 20 çalışmalı bir metaanalizde kronik HCV'li ağır alkol alan hastaların siroz gelişimi alkol almayan gruba göre 2.3 kat artmış olarak bulunmuştur⁴². Donato ve ark.'nın⁴³ yapmış olduğu çalışmada ağır düzeyde alkol alımının HSK riskini arttırdığı gözlenmiştir. HBV enfeksiyonu ve ağır alkol alımı ilişkisini göstermek için daha az çalışma mevcuttur. Japonya'da yapılan bir çalışmada ağır alkol alımının HBV ilişkili sirozlu hastalarda HSK riskini 3 kat arttırdığı gözlenmiştir⁴⁴.

2.1.12. Tütün Kullanımı ve Hepatoselüler Karsinom

Sigara içimi ve HSK arasındaki ilişkiyi göstermek için HSK insidansının yüksek ve düşük olduğu yerlerde 60'ın üzerinde çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında aralarında ilişki saptanırken bazılarında saptanamamıştır. 16 çalışmalı bir metaanalizde HBV ve sigara içiminin HSK riskini arttırmada additif etkileşimi görülürken, HCV ve sigara içiminin HSK riskini arttırmada supraadditif etkileşimi görülmüştür⁴⁵.

2.1.13. Aflatoksin B₁ ve Hepatoselüler Karsinom

Aflatoksin B₁ mısır, fıstık, fındık gibi besinler uygun koşullarda saklanmadığı zaman (sıcak, rutubet), besinlerin üzerinde oluşabilen *Aspergillus* familyası tarafından üretilen (*A.flavus* ve *A.parasiticus*) bir mikotoksindir. Kuvvetli bir hepatokarsinojendir.

Aflatoksin B₁ sindirildiğinde DNA'ya bağlanarak hasar veren aktif metaboliti olan 'AFB₁.exo.8,9. epoxide'e dönüşmektedir. AFB₁'in, aflatoksinin endemik olduğu alanlarda HBV enfeksiyonu olan HSK'lı hastaların yaklaşık % 30-50'sinde tümör süpresör p53'ün serin 249 bölgesinde mutasyona yol açarak HSK'ya neden olduğu gösterilmiştir^{46,47,48}.

2.1.14. Metabolik Sendrom ve Hepatoselüler Karsinom

HCV enfeksiyonlu hastalarda insülin rezistansı hepatosteatoz, ileri fibrozis ve HSK ile ilişkilidir. 2005'de yayınlanan bir metaanalizde diabet ve HSK arasında viral hepatit veya alkol kullanımı ilişkisi olmaksızın kuvvetli bir ilişki saptanmıştır⁴⁹. Diabet ve HSK arasındaki ilişki eşlik eden viral hepatit türü ile de ilgilidir. Diabet ve HCV enfeksiyonu olan hastaların HSK riski, HCV enfeksiyonu olmayanlara göre % 68 artmıştır. Ayrıca HCV ile enfekte kişilerin, HBV ile enfekte olanlara göre diabet gelişim riski daha yüksektir. Ancak HCV ve diabetin HSK riskinde sinerjistik etkileşimini gösteren az sayıda çalışma vardır^{50,51}. HCV enfeksiyonlulara göre karşılaştırıldığında HBV enfeksiyonu olan diabetik hastaların ileri evre karaciğer hastalığı ve HSK riskine dair daha az çalışması mevcuttur. Taiwan'da yapılan bir vaka-kohort çalışmasında kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda insülin rezistansının HSK riskini arttırdığı gözlenmiştir⁵².

2.1.15. Konağın Genetik Faktörleri ve Hepatoselüler Karsinom

HBV ve HCV enfeksiyonu geçiren birçok erişkin hastada siroz veya HSK hiç gelişmeyebilir. Viral hepatit öyküsü olmayan HBV taşıyıcılarının ve HCV enfeksiyonu geçirmiş kişilerin kohort ve vaka-kohort çalışmalarında ailede hepatoselüler kanser öyküsü olması HSK riski ile ilişkili bulunmuştur^{53,54}. Bu noktada konağın genetik faktörlerinin rolü olduğu düşünülmektedir.

2.1.16. Tümör Nekrozis Faktör- α Varyantları ve Hepatoselüler Karsinom

Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) polimorfizmi (-308 G>A) ile HSK riski arasındaki ilişkiyi araştırmak için 3 meta-analiz yapılmıştır. Metaanalizlerden birinde toplam 1362 hasta ve 2426 kontrolün olduğu 9 çalışmanın analizleri kullanılmıştır.

Meta-analizde TNF- α 'nın 308 baz proksimalindeki AA ve AG variantlarının, GG'ye göre HSK riskinin anlamlı ölçüde yüksek olduğunu göstermişlerdir⁵⁵.

10 çalışmanın verilerinin kullanıldığı diğer bir meta-analizde 1421 HSK hastası değerlendirilmiş ve TNF- α -308 GG polimorfizminin sağlıklı hastalara göre HSK grubunda belirgin düşük olduğu gözlenmiştir⁵⁶.

Eylül 2010'da yapılan diğer bir metaanalizde 2763 HSK hastası ve 4152 kontrolün TNF- α , interlökin (IL)-1B ve IL-10 polimorfizmlerinin HSK ile ilişkisi araştırılmıştır. Meta-analizde 20 çalışmanın verileri kullanılmıştır. Asya grubunda TNF α -308 polimorfizmi ile HSK riski arasında yüksek düzeyde ilişki bulunmuştur. Ancak TNF α -238 G/A, IL-1B T/C ve -511 C/T, IL-10 1082 G/A polimorfizmlerinin artmış HSK riski ile ilişkisi bulunamamıştır⁵⁷.

2.1.17. Glutathione S-Transferase Varyantları ve Hepatoselüler Karsinom

Glutathione S-transferase(GST) gen varyantları HSK ile ilgili genetik risk faktörlerini araştırırken en fazla çalışılan genlerdir. GST'ler hücreyi endojen oksidatif stresten korurlar. GSTM1 ve GSTT1'deki delesyonlarla sonuçlanan polimorfizmin etkilerini araştırmak için yapılan 2514 hasta ve 4416 kontrollü metaanaliz sonucunda son ürün üretmeyen GSTM1 ve GSTT1 formlarında HSK riskinin artmış olduğu gözlenmiştir⁵⁸.

2.2. Hepatoselüler Kanserin Klinik Özellikleri

HSK tanısı zor bir hastalık olup, genelde; serum markerları, bir ya da daha fazla görüntüleme yöntemi ve histolojik doğrulama gerektirmektedir. HSK'ya yönelik patognomonik semptomların olmaması ve karaciğerin büyük fonksiyonel rezervi sebebiyle hastalar genelde geç tanı almaktadır⁵⁹.

HSK'da medyan sağkalım 6-20 ay arasındadır⁶⁰. Kompanse sirozu olan bir kişide asit, ensefalopati, sarılık ya da varis kanaması gibi dekompanzasyon bulguları ortaya çıktığında HSK'dan şüphelenmek gerekir. Bu komplikasyonlar da sıklıkla tümörün hepatik ya da portal vene uzanımı ya da tümör tarafından oluşturulan arteriovenöz şant sonucudur⁶¹. Bazı hastalarda sağ üst kadranda ağrısı, kilo kaybı, palpabl kitle, diyare, obstruktif sarılık, intraperitoneal kanama, paraneoplastik semptomlar (hipoglisemi, eritrositoz, hiperkalsemi, deri bulguları gibi) tespit edilebilir⁶².

Hepatoselüler karsinom için bilinen en güçlü risk faktörü siroz ve bununla ilişkili HBV ve HCV enfeksiyonlarıdır. Ek olarak perinatal dönemde geçirilen HBV enfeksiyonlarının erken çocukluk döneminde siroz yapmadan HSK riskini artırıcı etkisi vardır⁶³⁻⁶⁵.

2.3. Hepatoselüler Karsinoma'da İzlem

Yüksek riskli hastalara HSK izlemi yapılmalıdır. HSK izlemi önerilen hasta grubu;

Tablo 1. Hepatoselüler Karsinom İzlemi Önerilen Hasta Grubu

Hepatit B hastaları (HBsAg+)	Hepatit B olmayan siroz hastaları
-Asya kökenli erkeklerde 40 yaş üzerinde,	-HCV enfeksiyonu olan siroz hastaları
-Asya kökenli kadınlarda 50 yaş üzerinde,	-Alkolik siroz hastaları
-Tüm sirotik Hepatit B hastalarında,	-Genetik hemokromatozisi olan siroz hastaları
-Ailede HSK öyküsü olan Hepatit B hastaları,	-Primer bilier siroz hastaları
-Afrika kökenli 20 yaş üzerinde olan Hepatit B hastaları,	-Alfa-1 antitripsin eksikliği ilişkili siroz hastaları
	-Nonalkolik steatohepatite bağlı siroz hastaları
	-Otoimmün hepatite bağlı siroz hastaları

Çin'de 19.000 HBV ile enfekte hastada yapılan randomize kontrollü bir çalışmada hastaların 6 ayda bir AFP ve USG (ultrasound görüntüleme) yapılmasının sağkalımı arttırdığı, HSK ilişkili ölümleri % 37 azalttığı gösterilmiştir^{66,67}. İzlem aralığını 1 yıla çıkarmakla, 6 ay arasında gösterilmiş bir fark olmayıp yılda bir izlemin etkinliği 6 ayda birine eşit olarak bulunmuştur^{66,68,69}. USG'nin HSK'yı tespit etmedeki performansı yapan kişiye, kullanılan teknolojiye, siroz varlığına ve tümörün boyutuna göre değişir. Çalışmalarda USG ile % 60 sensitivite ve % 90 spesivite ile HSK tanısı konulabilmektedir⁷⁰. USG'nin sensitivitesi sirotik karaciğerdeki tümör nodülünü göstermede daha düşüktür⁷¹⁻⁷³.

Serum AFP düzeylerinin HSK'yı saptama oranları % 25-65 arası değişmekte olup düşüktür. Serum AFP'nin üst sınırı olan 20 ng/mL sınır değer olarak kabul edilmektedir^{74,75}. Hepatoselüler karsinom olmadan hepatosit rejenerasyonu ile giden diğer durumlarda örneğin kronik karaciğer hastalığında da AFP'nin yüksek düzeylerine rastlanabilir^{76,77}. Bu yüzden AFP'nin izlemde tek başına kullanılması doğru değildir. USG'nin yanında değeri vardır ancak bu konudaki tartışmalar devam etmektedir.

Önerilen yüksek risk gruplu hastalarda kullanılmasıdır. Des- α -karboksi protrombin ve lektin-bound AFP (AFP-L3) taramada kullanılabilirliği konusunda yeterli veri yoktur.

2.4. Hepatoselüler Karsinomada Tanısal Amaçlı Görüntüleme

İzlem testlerinden biri anormalse veya HSK hakkında klinik şüphe varsa görüntüleme yöntemleri tanı ve tümörü evrelemek açısından çok önemlidir. Bu konuda en güvenilir tanısal testler trifazik bilgisayarlı tomografi (BT) ya da 3 fazlı dinamik kontrastlı manyetik rezonans görüntülemedir. (MRI)^{78,79} Hepatoselüler karsinom sıklıkla hepatik arterden beslenirken, tümör olmayan diğer karaciğer dokuları portal ven ve hepatik arterden beslenmektedir. HSK için karakteristik görüntü arteryel zenginleşmeyi takiben portal faz ve gecikmiş fazlardaki hipointens görünümle karakterize wash-out fenomenidir⁸⁰. Arteryel zenginleşmeyi takiben wash-out fenomeni % 90-95 sensitivite ve spesifite ile tanı koydurur. Ancak HSK hastalarının yaklaşık % 71'inde bu testi birden fazla yapmak gerekebilir. Testin tekrarlanması veya görüntüleme yöntemi ile tanı konulamaması durumunda karaciğer biyopsisi gerekebilir.

HSK'nın tanısında altın standart olan CT ve MR'ın doğruluğunu ve üstünlüğünü gösteren 4 çalışma mevcuttur⁸¹⁻⁸⁴. Bu çalışmaların sonucunda HSK'nın karakterizasyonu ve tanı koydurmada MRI, BT'ye göre biraz daha üstün bulunmuştur. CT ve MRI'nın performansı tümörün çapı ile de ilişkilidir. Örneğin 2 cm'in üzerindeki tümörlerde MRI'nın doğruluk oranı % 90'ın üzerindedir. Ancak tümör çapı 2 cm'in altına düştüğünde doğruluk oranı % 33'lere gerilemektedir⁸⁵.

2.5. Hepatoselüler Karsinoma'ya Tanısal Yaklaşım

HSK tanısında AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) rehberi kabul görmektedir⁸⁶. Rehberde bilinen kronik hepatit B'si ya da başka etyolojiye bağlı sirozu olanlarda insidental ya da taramalar esnasında karaciğerde kitle tespit edilirse; bu kitlenin muhtemelen HSK olduğu vurgulanmaktadır. Böyle bir hastada HSK tanısını koymaya yönelik adımlar kitlenin boyutuna göre yapılandırılmıştır.

Taramalar esnasında tespit edilen nodül 1 cm'den küçükse 3-6 ayda bir ultrason ile takip edilmeli, 2 yıla kadar nodül boyutunda artma olmazsa, hasta rutin tarama programına geçebilir.

1-2 cm nodül tesbit edilen sirotik karaciğerde en az iki tane dinamik görüntüleme (dinamik tomografi, kontrast ultrason, MRI) yöntemiyle ileri araştırma yapılmalıdır. En az iki teknikte tipik görüntü (örneğin: hipervasküler + portal/venöz fazda washout) mevcut ise lezyon HSK olarak tedavi edilebilir. Görüntüleme yöntemlerinde tipik görüntü yoksa lezyona biopsi yapılmalıdır.

Nodül 2 cm'den büyükse ve dinamik görüntüleme yönteminde tipik görüntü mevcut ise, HSK tanısı için biyopsi gereksizdir. Alternatif olarak AFP > 200 ng/ml üstünde ise de biyopsiye gerek yoktur. Eğer görüntülemelerde vasküler profil karakteristik değilse ya da nodül non-sirotik karaciğerde tespit edildiyse, biyopsi yapılmalıdır^{59,86}.

Radyolojik görüntüleme yöntemleri eşliğinde yapılan karaciğer biyopsisinin sensitivite ve spesifitesi USG eşliğinde % 90'a % 91, CT eşliğinde yapılan biopsilerde ise % 92'ye % 98'dir⁸⁷. Biopsinin negatif olması büyük oranda anlamlıdır ancak malignite tanısını % 100 dışlamaz. Nodül 3-6 ay aralıklarla kaybolana, büyüyene veya HSK'nın tipik görüntüsünü verene kadar izleme devam edilmelidir. Lezyon büyür ancak görüntü olarak HSK ile uyumsuz ise biopsi önerilmektedir⁸⁷.

2.6. Hepatoselüler Karsinom Tedavisi

Hepatoselüler karsinom tedavisi ve yönetimi⁸⁸, hepatoloji, cerrahi, tanısal ve girişimsel radyoloji, onkoloji ve patolojinin içiçe olduğu multidisipliner yaklaşımla sağlanabilir. Hasta ve tümöre ait faktörler, altta yatan hastalığın yaygınlığı, tümör yükü, ilişkili komorbid hastalıklar, cerrahi rezeksiyona, transplantasyon ve ablatif tedavilere uygunluğu tedavi seçiminde iyi düşünülmesi gereken konulardır⁸⁸.

Kansere ilişkin semptomların ortaya çıkmasından sonra hastaların sadece % 0-10'u, 5 yıl yaşayabilmektedir⁸⁹. Semptomlar oluşmadan önce tümör boyutları küçükken tanı konulursa; cerrahi rezeksiyon ve transplantasyon gibi küratif tedavi seçeneklerinin uygulanması durumunda 5 yıllık yaşam şansının yüksek olması, HSK'da erken tanı ve tedavinin önemini ortaya koymaktadır⁸⁹⁻⁹⁷. Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği'nin (AASLD) 2010 yılında güncellenen tedavi kılavuzu verilerine göre tam yanıt ve kür şansının olduğu bilinen tedaviler cerrahi rezeksiyon, transplantasyon ve perkütan ablasyondur^{97,98}. Bunun yanında transarterial embolizasyon (TAE), transarterial kemoembolizasyon (TACE) ve sorafenib gibi non-küratif tedaviler de vardır⁹⁹. Tamoksifen, anti-androjenler ve octreotide gibi ajanların tamamıyla etkisiz

olduğu kabul edilmektedir^{100,101}. Sistemik kemoterapinin etkisi ise sınırlıdır, sık toksisite yapar ve sağkalım süresini arttırdığı gösterilememiştir¹⁰².

2.6.1. Küratif Tedavi Yöntemleri

2.6.1.1. Cerrahi Rezeksiyon

Sirotik olmayan ve tek lezyona sahip hastalar için iyi bir tedavi seçeneğidir⁸⁹. Ancak hastaların batı ülkelerinde % 95, Uzakdoğu Asya ülkelerinde % 60'ı tanı anında sirotiktir⁹¹. Bu hastalar için de cerrahi rezeksiyon uygun bir tedavi seçeneği olabilir. Ancak bu tip vakalara işlem planlanırken post-operatif karaciğer yetmezliği riskini göz önünde bulundurmak gerekir.

Karaciğer sağ lob rezeksiyonu, sol loba göre post-operatif yetmezlik açısından daha riskli bulunmuştur^{91,92,103}. Sirotik hastaların cerrahi tedavi için seçilmesinde uzun yıllar kullanılan Child-Pugh evreleme sisteminin karaciğer rezervini tam olarak göstermediği kabul edilmiş olup, bu konuda yapılan çalışmalar sonucu; serum bilirubin düzeyinin normal saptanması ve hepatik ven kateterizasyon yöntemiyle ölçülmüş portal ven basıncının 10 mmHg değerinin altında olmasının, post-operatif karaciğer yetmezliği risk tahmini açısından hastaların Child-Pugh evrelerinden bağımsız olarak en değerli yol gösterici parametreler olduklarına karar verilmiştir¹⁰³. Bugünkü verilere göre sirotik olmayan ve sirotik olup rezeksiyon sonrası dekompanzasyon gelişmeyen hastalarda 5 yıllık sağkalım % 70 ve üzerindeyken, dekompanzasyon evresine geçen sirotik hastalarda bu değer % 50'nin altında kalmaktadır^{91,104}.

Bazı karaciğer tümörleri vasküler invazyon yapmadan büyük boyutlara ulaşabilir. Rekürrenste primer belirleyicinin damar invazyonu olması nedeniyle bu tümörlerin rezeksiyon sonrası rekürrens riski küçük boyutlu tümörlerden fazla değerlidir. Bu sebeple tümör büyüklüğü cerrahi açısından tam anlamıyla sınırlayıcı bir faktör değerildir^{91,105}. Rezeksiyonun başarısını arttırmak açısından intra-operatif olarak, tümörün kemoembolizasyonu ve kitleyi içeren hepatik loba gelen portal ven dalının embolizasyonu gibi çeşitli yöntemler denenmiştir. Ancak bunların hiçbirinin potansiyel faydası saptanmamış ve nüks açısından olası riskler taşıdıklarına kanaat getirilmiştir^{106,107}.

Son dönemde yapılan meta-analizler sonucu cerrahi rezeksiyon sonrası interferon alfa tedavisinin rekürrens riskini azalttığı gösterilmiş ancak bunun

interferonun yarattığı viral süpresyon sonucu olup olmadığı tam olarak anlaşılamadığından bugün için interferon alfa tedavisi de cerrahi rezeksiyon sonrası rutin önerilen bir tedavi seçeneği olamamıştır¹⁰⁸. Rezeksiyonu yapılmadan önce primer tümörün invazyon yapmış olması ve yeni tümörlerin oluşması nedeniyle rekürrens riski 5 yıllık süre içinde % 70'i aşmaktadır¹⁰⁹. Bu iki faktör tümör rekürrensini en kuvvetli belirleyicileridir^{91,110}. Rekürren tümörlerin büyük kısmı cerrahiden sonraki ilk 3 yılda meydana gelmektedir ve ne yazık ki yukarıda belirtildiği gibi rekürrens riskini azaltacak etkili bir neo-adjuvan veya adjuvan tedavi seçeneği gösterilememiştir^{110,111}. Rekürren tümörlerin tedavisinde; lezyon tekse cerrahi rezeksiyon şansı tekrar denenebilir ancak rekürrens, genelde primer tümörün intrahepatik yayılımı sonucu geliştiği için çoğu hastada multifokal olarak kendini göstermektedir. Bu tip vakalar için karaciğer transplantasyonu denenmelidir. Rekürrens riskinin % 70'in üzerinde olması ve rekürren tümörlerin tedavi şansının kısıtlı olması nedeniyle bazı otoriteler primer tümörün patoloji sonucunda vasküler invazyon raporlanan hastaların, cerrahiden hemen sonra transplantasyon listesine alınmaları gerektiğini önermektedir^{110,112}.

2.6.1.2. Karaciğer Transplantasyonu

Hepatosellüler karsinomda karaciğer transplantasyonu için aday gösterilen hasta grubu belirlenmiş olup bugün için erken evre vakalarda transplantasyon sonrası 5 yıllık sağkalım oranı % 74'e kadar çıkmıştır¹¹³. Milan kriterleri olarak da bilinen; 5 cm altında tek tümör veya 3 cm altında en fazla 3 tümör olması durumunda hastalar karaciğer transplantasyonu listesine alınmaktadır. Bu kriterlerin genişletilmesi için birçok çalışma yapılmış olsa da, bugün için Milan kriterlerinden başka etkinliği ispatlanmış ve kesin olarak önerilmiş bir şema yoktur⁸⁹.

Bağışlanan organ yetersizliği nedeniyle bir hastanın nakil listesine alınması ve transplantasyon işleminin gerçekleştirilmesi arasında süre geçmektedir. Bu sürenin 12 aya kadar uzaması durumunda hastaların % 25'lik bir kısmı yayılım ve hastalığın ilerlemesi sonucu artık transplantasyon için uygun kriterleri sağlayamadığından nakil listesinden çıkarılmaktadır¹¹⁴. Bundan dolayı hastaların transplantasyon için bekledikleri aşamada diğer tedavi seçeneklerinin uygulanması gündeme gelmiştir. Buna göre; 6 aydan uzun süreyle nakil sırası bekleyeceği öngörülen hastaların, mevcut tümörlerin büyüklüğüne göre radyofrekans (RF) ablasyon (RFA), perkütan etanol

injeksiyonu veya seçilecek başka bir uygun yöntemle tedavilerine başlanması gerekmektedir¹¹⁵. Aynı zamanda bekleme süresinin 7 ayı aşacağı düşünülen vakalarda canlı donörden nakil yapılması önerilmiş ve bunun sonucunda 5 yıllık yaşam beklentisinin % 50-70'lere kadar artabileceği bildirilmiştir. Ancak donörde meydana gelebilecek komplikasyon riskinin % 20-40, mortalitenin % 0,3-0,5 olması bu işlemin deneyimli merkezlerde yapılmasını zorunlu kılmaktadır¹¹⁶.

2.6.1.3. Perkütan Ablasyon Tedavileri

Perkütan ablasyon, cerrahi rezeksiyon ve transplantasyon için uygun olmayan erken evredeki hastalar ve transplantasyon listesinde bekleyen HSK vakaları için iyi bir tedavi seçeneğidir. Hedeflenen tümör dokusu içine etanol, asetik asit gibi kimyasal ajanlar verilmesi veya RF, laser ve kriyoterapi gibi işlemlerle, sıcaklık uygulanması esaslarına dayanan prosedürlerdir. Bu grup tedaviler içinde RFA yöntemi ilk seçenek olmalıdır⁸⁹. RF başarısı, 1 ay sonra yapılacak olan dinamik bilgisayarlı tomografi yöntemiyle değerlendirilebilir¹¹⁷. Etanol injeksiyonu bugüne kadar en iyi tecrübe edilmiş perkütan ablasyon yöntemidir ve 2 cm'den küçük tümörlerde % 90 oranında nekroz sağlayabilmektedir¹¹⁸. Bu oran 2-3 cm büyüklüğündeki tümörler için % 70, 3-5 cm büyüklüğündeki tümörler için % 50'ye gerilemektedir. Uzun dönem çalışmalar, etanol injeksiyonu yöntemiyle erken evre HSK vakalarında ortalama % 50 sağkalımın mümkün olabileceğini göstermiştir^{119,120}. Alkolün, tümör içi septalar olması nedeni ile 3 cm'den büyük tümörlerin içine tam olarak yayılamaması sonucu, etanol injeksiyonunun ilerleyen günlerde tekrarlanması gerekebilir. Bazı otoriteler bu gibi büyük kitlelerde etanol injeksiyonu yönteminin etkinliğini arttırmak için arteriyel embolizasyonla desteklenmesini önerse de asıl kabul edilen görüş, bu tip tümörlerde RFA yönteminin tercih edilmesidir¹²¹. Bu yöntemin etkinliği, 2 cm altındaki tümörlerde etanol injeksiyonu yöntemiyle benzer olsa da; daha geniş tümörlerde etkinlik belirgin olarak daha fazladır ve daha az seansla işlemin yapılabilmesi de ayrı bir avantajdır^{118,122}. Dezavantajları ise maliyetinin daha fazla olması ve % 10 oranında komplikasyon riskinin (plevral effüzyon, karaciğer enfarktı, peritoneal kanama, hepatik abse, tümör lizis sendromu ve % 0,3 oranında RF'a bağlı mortalite) olmasıdır¹²³⁻¹²⁵. Subkapsüler yerleşimli ve/veya kötü diferansiye tümörlerde peritoneal yan etki riski yüksek olduğu için bu tip kitlelerde RFA yöntemi uygulanmamalıdır¹²⁶.

Her iki yöntem (RF ve tümöre alkol enjeksiyonu) göz önüne alındığında 5 yıllık yaşam beklentisi RF için daha fazladır. RFA < 2 cm tümörlerde 5 yıllık yaşam şansının % 70 kadar yüksek olabilmesi nedeniyle cerrahi rezeksiyon yöntemiyle bile kıyaslanmıştır. Ancak cerrahi yöntemde tümörün bütününün ortadan kaldırılmasının mümkün olması sebebiyle, RFA yöntemi HSK'de ilk sıra tedavisi olarak kabul görmemektedir¹²⁷.

Japonya'da yapılan bir çalışmada, RF ve cerrahi rezeksiyon yöntemiyle tedavi edilmiş, < 2 cm tümöre sahip erken evre HSK tanılı hastalar takip edilmiş ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Hastaliksız yaşam süresinin cerrahi rezeksiyon yapılan hastalarda kısa ve uzun dönemde daha fazla olduğu belirlenmiş olup, total sağkalım süresi bakımından iki grup arasında belirgin fark saptanmamıştır¹²⁸.

2.6.2. Non-Küratif (Palyatif) Tedavi Yöntemleri

2.6.2.1. Trans-Arteriyel Embolizasyon-Kemoembolizasyon

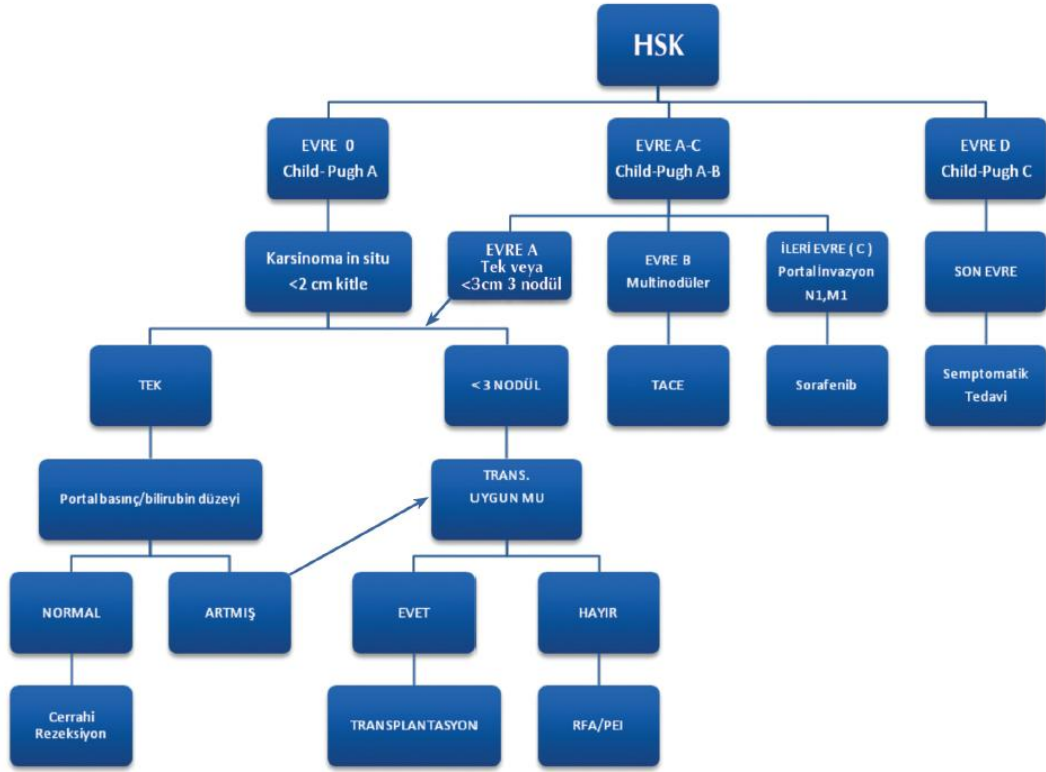
Hepatosellüler karsinom, progresyonu sırasında neo-anjiogenez yapan bir tümördür. Erken evrelerde portal venden beslenmekteyken, ileri evrelerde kan akımı hepatic arterden sağlanır. Besleyen arterin tıkanması suretiyle tümör içinde nekroz yaratılması işlemi transarteriyel embolizasyon (TAE) adını almaktadır. Bu işlem sırasında arter içine kemoterapötik ilaç (en sık adriamisin ve sisplatin) ile birlikte bu ilacın emiliminin ve tümör hücrelerine olan etkinliğinin artmasını sağlayan lipiodol gibi bir yardımcı maddenin verilmesi halinde, uygulanan prosedür transarteriyel kemoembolizasyon (TACE) adını alır¹²⁹. TAE/TACE, 5 cm'den büyük, multifokal ekstra hepatic yayılım göstermeyen ve küratif tedavilerin mümkün olmadığı kitleler için en uygun tedavidir. Vakaların yarısından fazlasında tümör nekrozu hedefine ulaşılır¹³⁰. İşlemden bir ay sonra bakılan tümör markerları sonuçları ve bilgisayarlı tomografi, magnetik rezonans gibi görüntüleme yöntemleri ile tedavi başarısı değerlendirilebilir. Hastaların % 2'den daha düşük bir kesiminde tedaviye tam cevap alınır, büyük bir kısmında ise beslenmesi azaltılan tümör dokusu zaman içinde kan akımını tekrar kazanır ve büyümeye devam eder. Ancak işlem sonrası büyüme daha yavaş olur ve beklenen yaşam süresi hastaların % 20-60'lık bir kesiminde kesin olarak uzar^{129,130}. TAE/TACE, biliyer obstrüksiyon, ensefalopati ve portal ven trombozu gibi durumlarda

kontrendikedir. Semptomatik, ileri karaciğer yetmezlikli olgularda işlem sonrası mortalite riski artmış olduğundan bu hasta grubuna da TAE/TACE uygulanmamalıdır.

TACE komplikasyonları RF ile benzerdir, yan etkileri kullanılan kemoterapötik ajanın yan etkilerinden oluşmaktadır (bulantı, kusma, kemik iliği depresyonu, alopesi, renal yetmezlik vb). Hepatik arterin akut iskemisi sonucu ise, hastaların yaklaşık yarısında post-embolizasyon sendromu adı verilen, kendini ileus, ateş ve karın ağrısıyla gösteren bir klinik tablo meydana gelir. Ateş, çoğunlukla vücut tarafından tümör nekrozuna verilen bir cevap olsa da; bazı hastalarda kolesistit ve hepatik abse gibi enfeksiyöz bir sebebe bağlı da gelişmiş olabilir. Post-embolizasyon sendromu hastaların büyük bir kısmında 48 saat içinde kendi kendini sınırlar ve düzelir. Portal ven trombozu gibi kontrendikasyonlar varlığında TAE/ TACE tedavisinin uygulanamaması durumunda bu grup hastalarda iyi tolere edilebilen transarteriyel radyoembolizasyon yöntemi uygulanabilir. Diğer iki yönteme benzer şekilde radyoembolizasyonda da yttrium-90 veya iodine-131 içeren partiküller hepatik arterde emboli oluşturmak amacıyla kullanılır. Hakkında yapılmış çok sayıda çalışma olmamakla beraber, portal ven trombozlu ve sirozu olmayan hastalarda ortalama yaşam süresini uzattığı belirtilmektedir¹³¹.

2.6.2.2. Sorafenib

TACE tedavisinden fayda görmemiş ileri evre hepatosellüler karsinom vakarında kullanılan FDA onaylı multikinaz inhibitörü ilaçtır. Buraya kadar bahsedilen efektif prosedürlerle daha fazla fayda görmeyeceği düşünülen ve karaciğer fonksiyonları korunmuş hastalarda palyasyon amacıyla endikedir. Hastaların % 5'inde parsiyel cevap oluşturabilir, sağkalım ve hastalığın progresyon süresini plasebo grubuna göre yaklaşık 3-4 ay uzattığı belirlenmiştir. Diyare, el-ayak-deri reaksiyonu, yorgunluk gibi yan etkileri mevcuttur ancak ilaca bağlı mortalite henüz bildirilmemiştir. Sorafenib dışında denenmekte olup FDA onayı almamış, faz 3 çalışmaları tamamlanmamış ilaçlar; bevacizumab, cetuximab, erlotinib, sunitinib olarak sıralanabilir. Bu ilaçlardan cetuximab ve erlotinib ile tedavi edilen hastaların faz 2 çalışmalarda ortalama yaşam sürelerinin sırasıyla 9,6 ve 13 ay olduğu bildirilmiştir¹³².



Şekil 4. BCLC hepatoselüler karsinom tanı ve tedavi algoritması

Buraya kadar anlatılan tedavilerin özeti olarak; Barcelona Clinic Liver Cancer tarafından belirlenen ve yaygın olarak kullanılan HSK tanısı almış vakalardaki tedavi yaklaşımı Şekil 4’te gösterilmektedir⁸⁹.

HSK günümüzde halen % 80-90 oranında efektif tedavi uygulanamayacak aşamada tanı koyulan ve bu sebeple vakalarının büyük bir kısmı 2 yıl içinde kaybedilen agresif bir tümördür. Ultrasonografi ve tümör belirteçleri ile düzenli aralıklarla taramaları yapılan kronik hepatitli hastalara erken evrede tanı konabilmektedir. Bu hastalar küratif yöntemlerle tedavi edilmekte ve 5 yıllık sağkalım oranları % 70 ve üzerinde olabilmektedir. Ancak diğer bir problem de küratif yöntem sonrası vakalara uygulanacak nüks önleyici tedavilerin yetersizliğidir. Bu amaçla denenmiş tüm tedavilerin efektif olmadığı bildirilmiştir. Hastaların büyük bir bölümünde 5 yıl içinde nüks görülmektedir. Küratif tedavi uygulanamayan vakalara palyasyon amaçlı tedaviler denenmekte olup sağkalım süresinin uzatılması amaçlanmaktadır. Tirozin kinaz inhibitörleri ve büyüme faktörleri reseptör blokerleriyle yapılan çalışmalarda başarılı

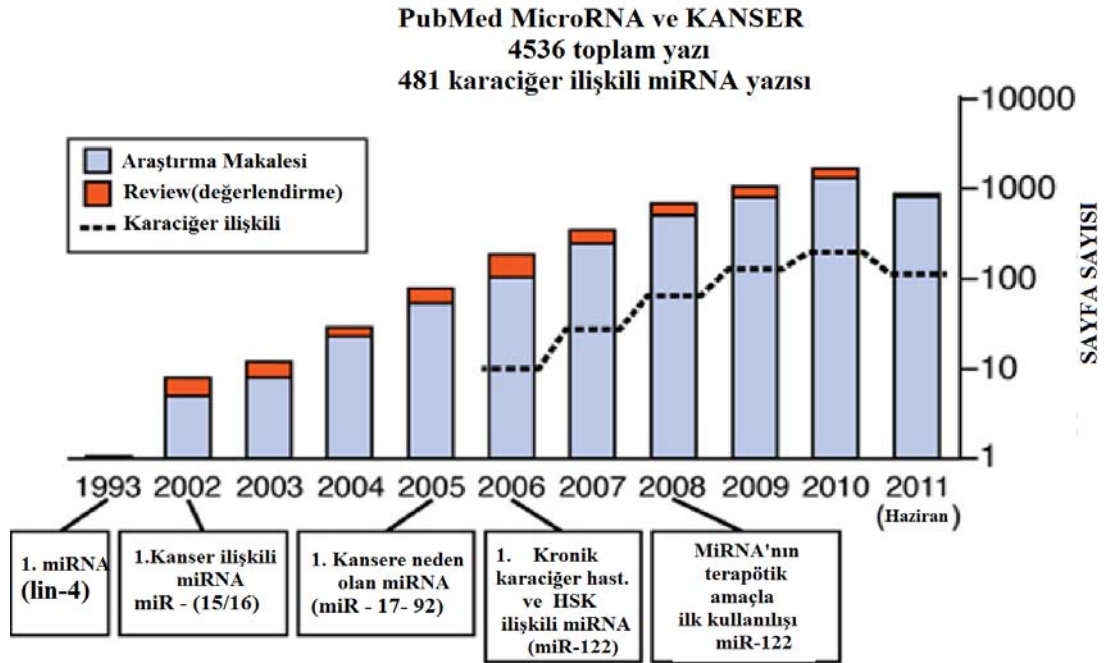
sonuçlar alınmıştır ancak bunların başarısı da beklenen yaşam sũresini en fazla 6 ay uzatmakla sınırlı kalmıřtır⁸⁹.

Yeni tedavilere duyulan ihtiyaç gũnũmũzde de devam etmektedir. Bu amaçla birçok çalışma yapılmaktadır. Hepatoselũler kanser patogenezi daha iyi anlamaya çalışmak tanı ve tedavide bize yol gũsterici olacaktır. Hepatokarsinogenez yolağındaki molekũler yolakların daha iyi anlaşılması hastalığın tanısı, tedavisi ve hatta ũnlenmesinde ũncũ olabilir.

MicroRNA'lar hepatokarsinogenezin başlangıcı, ilerlemesi konusunda hepatolojiyi her geçen gũn daha fazla aydınlatmaktadır.

3. KANSER VE MİKRO-RNA

Kanser esas olarak kontrolsüz proliferasyon ve hasarlı hücrelerin hayatta kalması ile sonuçlanan bir süreçtir. Hücreler düzgün bölünme, farklılaşma ve ölüm aşamasında birçok kontrol mekanizmasına sahiptir. Birçok regülatuar faktör bu aşamalarda genleri aktive ya da inaktive ederek bölünme, farklılaşma ve kontrollü hücre ölümünü programlamaktadır. Bu genlerin (tümör süpresör gen ve onkogen) hasarlanması kanserle sonuçlanır. Birçok tümör süpresör gen ya da onkogen etkilerini göstermek için önce ilgili genin DNA'sından RNA elde edip ilgili proteini sentezleterek etki göstermektedir. Yeni çalışmalarda küçük, protein kodlu olmayan RNA moleküllerinin de 'microRNA, miRNA'tümör süpresör gen ya da onkogen gibi aktivite gösterdiği gösterilmiştir¹³³.



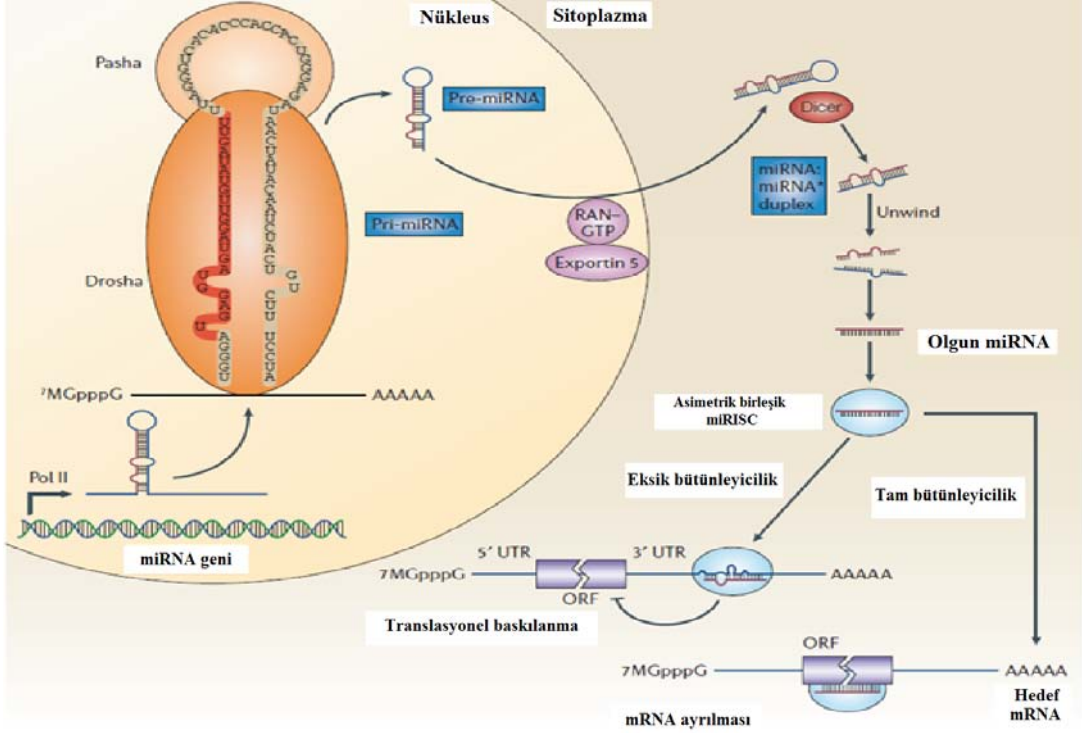
Şekil 5. Kanser ve MicroRNA'larla ilgili yapılan çalışmalar

MicroRNA lar hayvanlar ve bitkilerde yeni tanımlanmış, selüler proliferasyon, farklılaşma ve apoptoziste geniş biyolojik etkileri olan, protein kodlu olmayan, tek

zincirli, 20-22 nükleotidli bir dizi negatif gen regülatörüdür. İnsan genomunda şu ana kadar tanımlanmış 1800'e yakın microRNA (www.mirbase.org) mevcuttur. Tüm genlerin içerisinde % 1-4'lük bir yer kapladığı için microRNAlar gen regülatörlerinin içerisindeki büyük gruplardan birisidir¹³⁴⁻¹³⁶.

3.1. MicroRNA Biyogenezi

MiRNAların transkripsiyonu, nükleusta, başında MGpppG kepi ve poliadenilat kuyruğu olan pri-miRNA transkriptlerinin RNA polimeraz II enzimi ile reaksiyonu ile başlar. Ve bu pri-miRNA transkriptinden kofaktörü Pasha olan RNA polimeraz III (Drosha) enzim kompleksi sayesinde ortalama 70 nükleotid içeren pre-miRNA prekürsör ürünü oluşur. RAN-GTP ve Exportin 5 pre-miRNA'yı nükleustan sitoplazmaya taşır. Daha sonrasında başka bir RNase III enzimi olan Dicer, pre-miRNA'dan yaklaşık 22 nükleotidlik miRNA duplex'ini oluşturur. Bu duplex 'miRNA ilişkili multiprotein RNA indükleyici-susturucu (miRISC kompleksi)' içinde yüklü olarak kalır. Bu kompleks içerisinde Argounate proteinler ve matür tek zincirli miRNA bulunur. Matür miRNA'nın mRNA üzerindeki hedef bölgesine bağlanması iki şekilde olur. Eğer miRNA hedef mRNA'ya eksik bütünleyicilik ile bağlanırsa ilgili mRNA'nın translasyonunu negatif yönde etkiler ve translasyonu bloke eder. Ve genelde bu yolu kullanan matür miRNAlar hedef mRNA ya 3'UTR bölgesinden bağlanır. Eğer matür miRNA hedef mRNA'ya tam bütünleyicilik ile bağlanıyorsa mRNA translasyonunu indükler. Bu mekanizmayı kullanan miRNAlar ise daha çok hedef mRNA'ya kodlama sekansı veya açık okuma çerçevesindeki bölgelerden bağlanırlar. (opening reading frame, ORF) (Şekil 6)



Şekil 6. MicroRNA biyogenezi

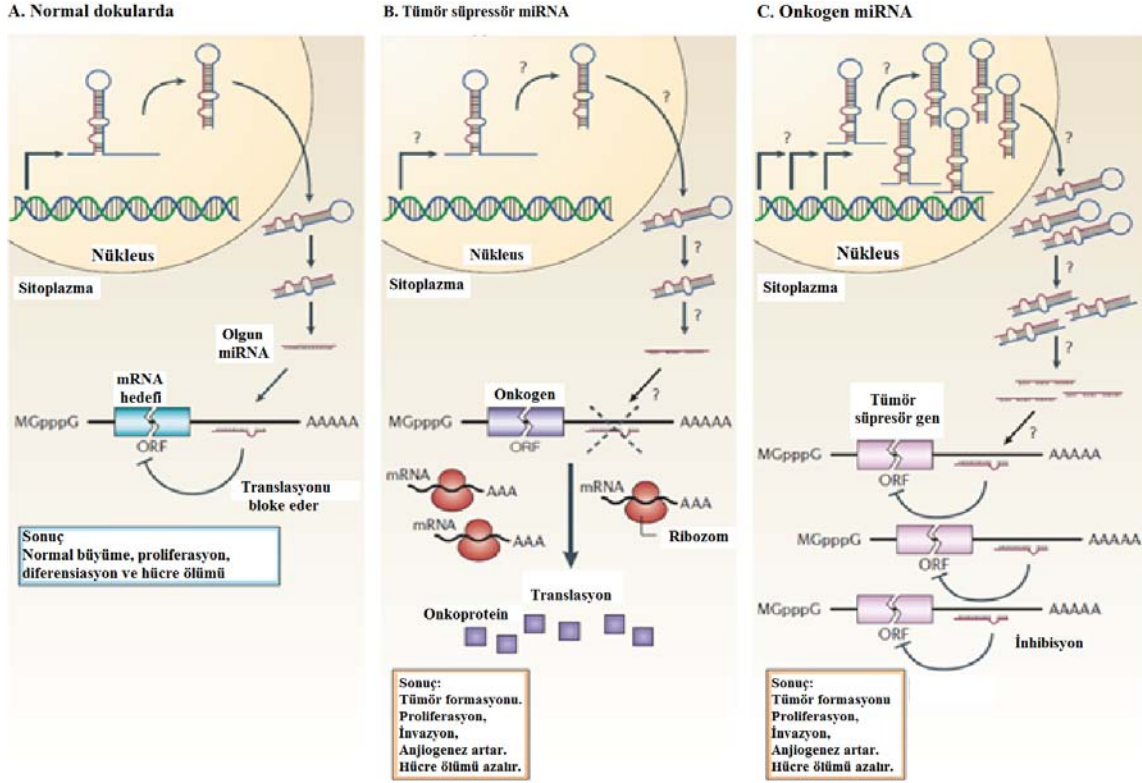
3.2. Tümör Süpresör/Onkogen miRNAlar

Normal dokularda düzenli miRNA transkripsiyonu ve hedef mRNA'ya bağlanma protein translasyonunu bloke ederek normal boyutta büyüme, proliferasyon, diferensiyasyon ve hücre ölümü sağlar. (Şekil 7A)

Tümör süpresör görevi üstlenmiş bir miRNA'nın redüksiyonu ya da delesyonu tümör formasyonu ile sonuçlanır. Şekil 7B'de soru işareti olarak görülen tümör süpresör miRNA'nın biyogenez aşamasındaki herhangi bir redüksiyon ya da delesyon olması durumunda matür miRNA hedef mRNA'ya bağlanamayacağından ilgili translasyonu durması gereken yerde durduramaz ve onkoproteinler oluşur. Bunun sonucunda artmış proliferasyon, invazyon, angiogenez, programlı hücre ölümünün durması, undiferansiye veya dediferansiye doku oluşumu gözlenir. Bu durumda kaçınılmaz sonuç tümör formasyonudur.(Şekil 7B)

Onkojenik rolü olan bir miRNA'nın amplifikasyonu veya overekspresyonu tumor formasyonu ile sonuçlanabilir. Bu durumda uygunsuz zamanda ya da uygunsuz dokuda artmış miRNA düzeyi, miRNA-hedef mRNA arasındaki tumor süpresör ilişkinin eliminasyonuna neden olarak tümör oluşumuna zemin hazırlar. Aynı zamanda

artmış matür miRNA hedef mRNA'ya ORF (opening reading frame)'den bağlanarak promoter bölgesini harekete geçirebilir ve onkogen oluşumunu hızlandırabilir. (Şekil 7C)



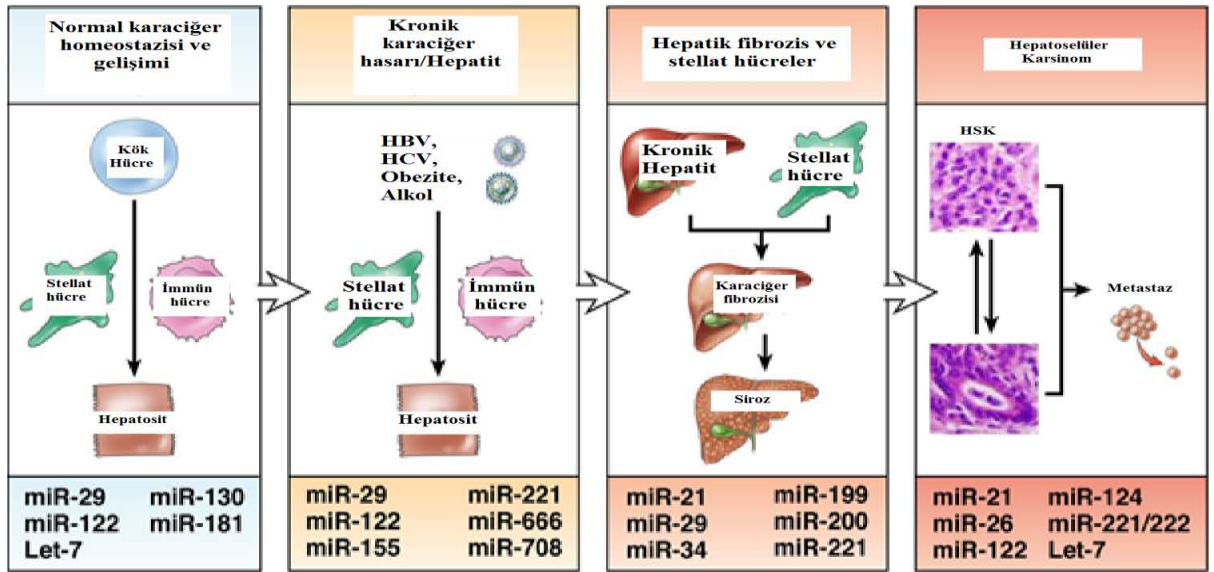
A. Normal dokuda, B.Tumor süpresör görevi, C. Onkogen görevi

Şekil 7. Tumor süpresör/Onkogen miRNAlar

3.3. Karaciğer Hastalıklarında miRNA'ların Yeri

Karaciğer organogenezi ve gelişiminde miRNA'ların yeri iyi tanımlanmıştır¹³⁷. Karaciğer gelişiminde kök hücre regülasyonu ve diferensiasyonunda rolleri vardır. miR-122 ekspresyonu karaciğere spesifiktir ve miR-122'nin fare karaciğerinde ekspresyonu inhibe edildiğinde kolesterol ve lipid metabolizmasındaki enzimlerin down-regüle olduğu gözlenmiştir¹³⁸. miR-181 ailesinin üyeleri embriyonik karaciğerde yüksek düzeyde eksprese edilir ve karaciğer organogenezini regüle eden transkripsiyon faktörü GATA6'yı¹³⁹ kodlayan mRNA'yı hedefler¹⁴⁰. miRNA'ların karaciğer gelişimindeki rollerini anlamak bize karaciğer patofizyolojisini ve kanser patogenezini anlamada

yardımcı olacaktır. Birçok farklı karaciğer hastalığında birçok farklı miRNA'nın rol oynadığı bilindiğinden miRNA'lar ve gelişim arasındaki bu yakın ilişki şaşırtıcı değildir. Mevcut birçok çalışma miRNAların karaciğer kanseri başlangıcı ve progresyonuna odaklanmış olsa da kronik karaciğer hastalığındaki çalışmalar da gün geçtikçe artmaktadır.



Şekil 8. miRNAların kronik karaciğer hastalığı patogenezi ve kanserdeki rolleri

3.3.1. Viral Hepatitlerde miRNA'ların Rolü

Karaciğere spesifik miRNA-122 HCV'nin karaciğere tropizmine eşlik ederek ribosomların viral RNA'ya bağlanmasını dolayısıyla HCV translasyonunun stimülasyonunu sağlar¹⁴¹. miR-122'nin inhibisyonu HCV replikasyonunu bloke edebilir. Bu gelişme miRNA bazlı ilk klinik çalışmaya önderlik etmiştir¹⁴². (Şekil 8)

3.3.2. Alkolik ve Nonalkolik Karaciğer Hastalığında miRNA'ların Rolü

Alkolik karaciğer hastalığı (ALD, alcoholic liver disease) dünya çapında kronik karaciğer hastalığının majör bir nedenidir ve fibrozisle birlikte siroza ilerleyebilir¹⁴³. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease) endüstrileşmiş batı ülkelerinde kronik karaciğer hastalığının en sık nedeni gibi

görülmektedir. NAFLD gelişmiş ülkelerde erişkin nüfusun % 25-30 unu etkiler ve insülin rezistansı, metabolik sendrom, obezite ve tip 2 diyabet kavramları ile içiçedir¹⁴³.

ALD'nin patogeneğinde miRNA'ların rolü vardır. MiR-125b, miR-146a ve miR-155 Kupffer hücrelerinde lipopolisakkaritle indüklenmiş TNF- α inflamatuvar yanıtını regüle etmektedir¹⁴⁴. Kupffer hücresine spesifik miR-155'in alkolle indüklenmiş TNF- α aktivasyonuna eşlik ettiği daha sonraki çalışmalarda gösterilmiştir¹⁴⁵.

MiR-34a ve miR-122 düzeylerinin NAFLD'de arttığı gösterilmiştir¹⁴⁶. Bu microRNA'lar ALD ve NAFLD'de tanı ve tedavide marker olarak kullanılabilir.

3.3.3. Fibrozis ve miRNAlar

Karaciğer fibrozisi karaciğerde kronik hasarlanmanın bir sonucudur. Hepatik stellat hücrelerin ve Kupffer hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerin fibrozis ve kronik karaciğer hastalığı gelişimine katkısı vardır. Yeni çalışmalar hepatik stellat hücrelerdeki TGF- β (transforming growth factor β) ve nükleer faktör κ B arasındaki sinyal nexusunu miR-29'un regüle ettiğini göstermiştir¹⁴⁷. MiR-29 ailesinin üyeleri ileri fibrozisi olan hastalarda ve karbon tetra klorür ile fibrozis indüksiyonu yapılan fare karaciğerlerinde belirgin olarak düşük saptanmıştır. Ek olarak miR-29b hepatik stellat hücre aktivasyonunu baskılayarak karaciğer fibrozisini yavaşlatabilir hatta engelleyebilir¹⁴⁸. Diğer çalışmalarda karaciğer fibrozisi ilerledikçe miR-199 ve miR-200'ün üretimini arttığı gösterilmiştir¹⁴⁹.

3.4. Hepatoselüler Karsinom ve miRNAlar

Farklı etnik gruplar ve farklı evrelerdeki HBV ve HCV ilişkili HSK'larda yapılan gen ekspresyon çalışmalarda miRNA'ların birçok ekspresyon paterninin olduğu gözlenmiştir¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Bu çalışmalarda kromozom amplifikasyonu veya delesyonu ilişkili miRNA 151 onkojenik potansiyeli nedeniyle bir onkomir olarak tanımlanmıştır¹⁵⁵. Yeni bir başka çalışmada ise miR-199a/b-3p'nin HSK hücrelerinde down-regüle olduğu ve bu sayede PAK4-Raf-MEK-ERK yolağını inhibe ederek HSK'nın büyümesini süprese ettiği gözlenmiştir¹⁵⁶.

HSK ile ilişkili birçok çalışmada yeni miRNAlar tanımlanmıştır. Genel olarak HSK'da let-7, miR-122, miR-26 ve miR-101 down-regüle iken, miR-221, miR-181 ve

miR17-92'nin upregüle olduğu gözlenmiştir. Bu miRNAlar gelecekte biyomarker ya da tedavi hedefi olarak kullanılabilirler.

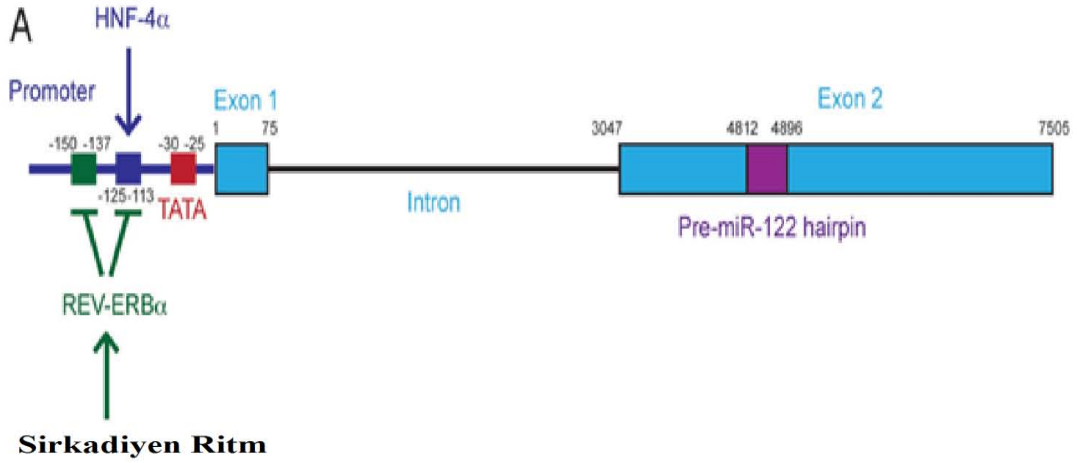
Metastatik ve nonmetastatik HSK'lı hasta örneklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada düzeyi değişmiş 20 miRNA (let-7g ve miR-122a'yı içeren)'nin HSK'nın venöz metastazları ile ilişkisi bulunmuştur¹⁵⁷. Venöz metastazlı HSK'larda bakılan bu 20 miRNA'nın 16'sında down-regülasyon gözlenmiş ve bu miRNA düzeylerinin azalması HSK'nın tümör progresyonuna katkıda bulunmuştur. Bu miRNA'ların içlerinden bir tanesi olan miRNA-122 (hepatosit spesifik miRNA)'nin down regülasyonu HSK'nın büyümesini indüklemiş ve HSK hücrelerinin migrasyonunu artırarak invaziv aktivitelerini arttırmıştır. Bu yüzden miR-122 HSK metastazının bir baskılayıcısı olabilir^{158,159}.

3.5. Microrna 122 (miR-122)

MicroRNA 122, karaciğere spesifik ve karaciğerde en çok bulunan miRNA'dır¹⁶⁰. Hepatosit büyümesi, diferansiasyonu, kolesterol metabolizması ve stres yanıtında önemli role sahiptir. Erişkin karaciğerinde hepatosit başına yaklaşık 66.000 kopya miR-122 bulunmaktadır¹⁶¹.

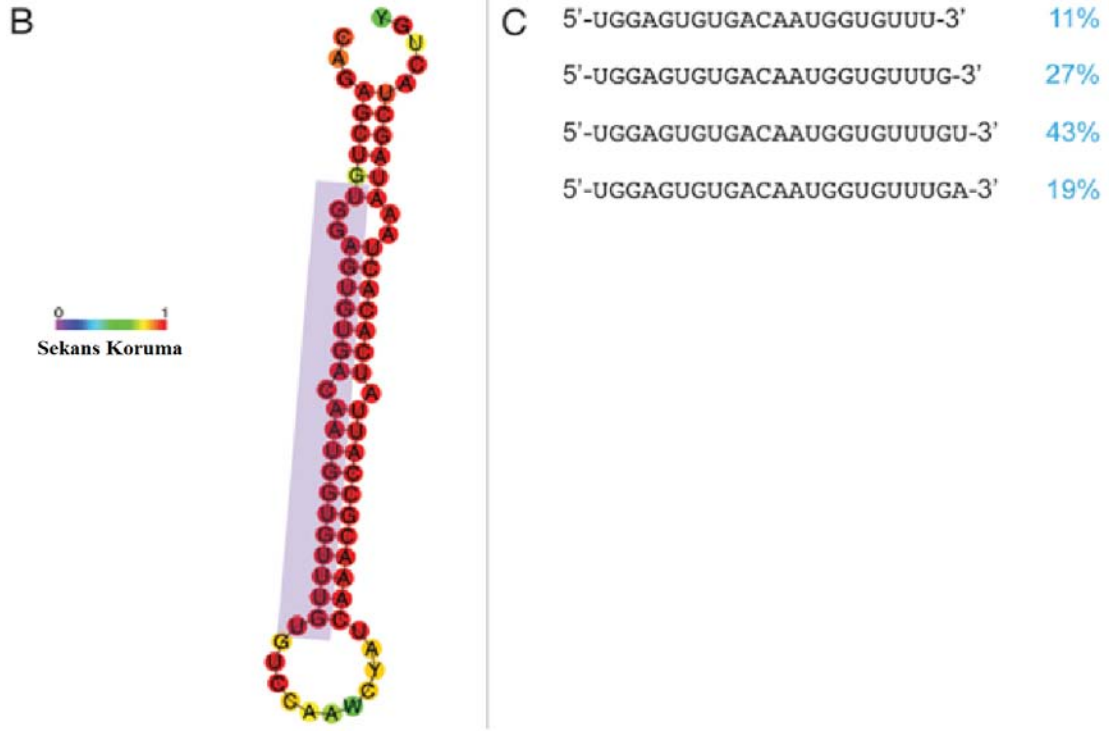
MiRNA-122 kromozom 18'in üzerindeki tek genomik loküsten üretilmektedir. RNA polimeraz II enzimi tarafından nükleer transkript olan pri-miRNA sentezlenir. Pri-miRNA Drosha (RNA polimeraz III) enzim kompleksi tarafından pre-miRNA ya dönüştürülür. Exportin 5 ile sitoplazmaya taşınır. Daha sonra Dicer ile matür miRNA'ya dönüştürülür.

Şekil 9A'da pri-miR-122 geninin yapısı ve transkripsiyonel düzenlenmesi görülmektedir. Transkripsiyonel başlangıcı anlamak için bu gendeki Pre-miR-122 sekansı ve promotera ait 2 ekson bölgenin ilişkisini iyi tanımlamak gerekir¹⁶². HNF-4 α , promoter bölgeyi aktive ederek pri-miR-122 transkripsiyonunu arttırırken, REV-ERB α sirkadiyen ritimle transkripsiyonun baskılanmasından sorumludur. REV-ERB α bu baskılamayı promoterdaki 2 bölge üzerinden yürütür. EXON 1'in (-125) – (-113) baz proksimalindeki bu promoter bölgesi hem HNF-4 α ile aktivasyona hem de REV-ERB α ile inhibisyona uğramaktadır¹⁶³.



Şekil 9-A. pri-miR-122'nin yapısı ve transkripsiyonel düzenlenme

Şekil 9-A'da transkripsiyon sonrası pre-miR-122 ve eflatun rengin içerisinde matür miR-122 görülmektedir. MiRNA'ların posttranskripsiyonel modifikasyonlarında genelde 3'uca bir ya da iki nükleotid eklenmesi sık gözlenen bir durumdur. Ancak miR-122 için posttranskripsiyonel 3'adenilasyonu miRNA stabilizasyonunu sağlamada önemli bir faktördür. Mass spektrometri ile miR-122'nin fare karaciğerinde birçok farklı izoformuna rastlanmıştır. Şekil 10.B-C'de fare karaciğerinde üretilen farklı miR-122 formları gösterilmiştir. Bu formlardan 3'kuyruğunda tek adenozin bulunan formuna bu nükleotid non-canonical poly(A) polimerazı GLD-2 tarafından eklenmiştir¹⁶⁴. GLD-2 $-/-$ farelerde total miR-122 düzeyi azalmış olup miR-122'nin dağılıp parçalanması kolaylaşmıştır. Bu 3'adenilasyonun miR-122 yi daha stabil tuttuğu düşünülmektedir. 3'adenilasyon olmadığında miR-122'nin hangi yolakla dağıldığı henüz tespit edilememiştir. GLD-2'nin miR-122'den sonra birçok farklı miRNA da adenilasyon yaptığı gösterilmiş, yapılan bu adenilasyonun yıkımı önlemek dışında başka olası etkilerinin de olabileceğinden bahsedilmiştir¹⁶⁴.



Şekil 10. B ve C: pre-miR-122 sekansı ve matür 23 nükleotidli miR-122 (eflatun renkte), matür miR-122 formları

Farelerin embriyonik fibroblastlarında miR-122'nin GLD-2 tarafından modifikasyonu gözlenmiş ve bu hücrelerde sitoplazmik poliadenilasyon element bağlayıcı proteinin (CPEP, cytoplasmic polyadenilation element binding protein) p53 poliadenilasyon/translasyonunu arttırarak hücre yaşlanması ile ilişkisi gösterilmiştir¹⁶⁵. miR-122 iki 3'UTR bağlantı bölgesi yardımıyla CPEP ekspresyonunu down-regüle etmekte ve GLD-2'nin deplesyonu miR-122 düzeyini azaltarak, CPEP ve p53'ü stimüle etmektedir¹⁶⁵. miR-122'nin karaciğer dışı bu dokulardaki görevleri ilginçtir ve diğer dokulardaki çok düşük düzeydeki miR-122 düzeyinin diğer başka hedeflerle içiçe olduğu düşünülmektedir.

MiR-122'nin karaciğerde tanımlanabilmiş metabolik, antiinflamatuvar ve antitümörogenik birçok etkinliği vardır¹⁶⁶. Lipid metabolizması^{167,168}, hücre diferensiasyonu¹⁶⁹, hepatik sirkadiyan regülasyon¹⁷⁰, HCV replikasyonu¹⁷¹, sistemik demir homeostazisindeki¹⁷² görevleri gösterilmiş olup, alkolik steatohepatitte¹⁷³, karaciğer sirozunda¹⁷⁴ ve hepatoselüler kanserde doku ve hücre bloklarında düzeyinin azaldığı bilinmektedir. MiR-122'nin karaciğer patofizyolojisindeki görevlerinin bir kısmı tanımlanabilmiş olup bir kısmınınsa hala tanımlanamadığı düşünülmektedir.

3.6. Hepatoselüler Kanser ve miR-122

MiR-122, hepatoselüler karsinomada negatif bir role sahiptir. HSK'da farklı bir çok hedef moleküle bağlanarak hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz ve anjiogenez üzerinde tümör süpressör etkinlik göstermektedir. MiR-122'nin insan HSK dokularında belirgin düzeyde düştüğü birçok referans çalışmada gösterilmiştir¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Ve miR-122'nin down-regülasyonu HSK'da kötü prognostik bir faktör olarak görülmektedir. Bu çalışmaların sonucunda miR-122'nin hepatokarsinogenezde tümör süpresör bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

Antitümör etkinliği olan miRNA'lar tümör gelişimini onkogenleri negatif yönde etkileyerek veya hücre kontrol mekanizması olan apoptozisi düzenleyerek yapmaktadır¹⁷⁹. Lin ve ark.'nın¹⁸⁰ yaptığı çalışmada miR-122'nin antiapoptotik Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bcl-w'nun 3'UTR bölgesine bağlanarak etki ettiği gösterilmiştir. miR-122, bcl-w'nin 3'UTR bölgesine bağlanarak selüler mRNA ve Bcl-w'nin protein düzeylerini düşürür, kaspase-3'ü aktiveleştirerek tümör hücrelerini apoptozise sürükler.

Xu ve ark.nın¹⁸¹ yaptığı çalışmada ise Wnt gen ailesi üyelerinden biri olan Wnt-1'in 3'UTR bölgesine bağlanan miR-122'nin Wnt-1'in posttranskripsiyonel düzeylerini düşürdüğü gözlenmiştir. Düzeyi düşen Wnt-1'in β -catenin ve TCF-4 proteinlerinde down regülasyona neden olmaktadır. Wnt-1 hepatoselüler kanserde düzeyinin çok arttığı gösterilmiştir¹⁸²⁻¹⁸⁵. Wnt-1 transmembran reseptörüne bağlandığında LDL reseptör ilişkili protein 5 ve 6 kompleksi hücre içi yolakları fosforilasyonla aktive eder. B-catenin aktifleşir ve B-catenin selüler proliferasyon, diferensiasyon ve apoptoziste görevlidir. Düzeyi çok artan β -catenin tümör dokuda undiferensiasyon ve antiapoptotik süreci başlatır. miR-122 ise Wnt/ β -catenin yolağında supresyon yaparak antitümöral etkinlik göstermektedir¹⁸¹.

Tümöral dokuda düzeyi azalan miR-122'nin karaciğerdeki hasara bağlı olarak serum ya da plazmada artacağı düşünülmektedir¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Ve bu yüzden hepatoselüler kanserde miR-122'nin yeni bir kanser tanı, tedavi ve prognoz markeri olabileceği düşünülmektedir¹⁸⁹.

Biz de çalışmamızda farklı kliniklerde takip edilen farklı evrelerdeki 43 hepatoselüler kanserli hastanın kanında real-time PCR metodu ile serumunda miR-122'yi göstermeyi ve bu değerleri hastaların diğer diagnostik, klinik, prognostik verileriyle karşılaştırmayı hedefledik.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Balcalı Hastanesinde 2011-2012 yıllarında yatarak tedavi gören veya poliklinik kontrolüne gelen 43 HSK hastasından ve 43 kontrol grubu hastadan toplanan periferik kan materyal olarak kullanıldı. 2 hepatoselüler kanserli olgunun karaciğer nakli öncesi ve sonrası kanları alındı.

Çalışma için Çukurova Üniversitesi Etik Kurul onayı alındı. Tüm hastalarda tam fiziki muayene yapıldı. Hastalardan hepatit markırları (HBsAg, antiHBs, anti-HBcIgG, anti-HCV), tam kan sayımı (CBC), protrombin zamanı (PTZ), uluslararası normalleştirme oranı (INR), ferritin, glukoz, üre, kreatinin (Cr), Aspartat Amino Transferaz (AST), Alanin Amino Transferaz (ALT), Albümin, total bilirubin, direk bilirubin, kalsiyum, serum alfa fetoprotein (AFP) düzeyleri çalışıldı. HBsAg(+) vakaların serumundan HbeAg, antiHbe, antidelta, serum PCR ile HBVDNA, antiHCV(+) hastaların serumundan HCV RNA düzeylerine bakıldı. Hastalara USG, portal RDUSG, Dinamik MR/Dinamik BT görüntülemeleri yapıldı. Hastaların Child-Pugh ve MELD skorları hesaplandı. BCLC evreleri belirlendi. Hastalar portal invazyon, asit, siroz varlığı ya da yokluğu, hepatit durumu (HBV ve HCV koenfeksiyonu, HBV ve HDV koenfeksiyonu, kriptojenik, otoimmün, alkolik, sağlıklı), sigara ve alkol kullanımı durumlarına göre sınıflandırıldı. Hastalarla aynı yaş ve aynı cinsiyetteki kontrol grubu hastalardan ise hepatit markerları, AST, ALT, Albumin, Total bilirubin, Direk bilirubin, kalsiyum, tam kan sayımı, koagülasyon markerları çalışıldı. Karaciğerde kitle tarama testi olarak kontrollere batin USG yapıldı.

Çalışmaya alınan gruplardan 2,5 ml periferik kan, RNA latter solüsyonu içeren tüpe alındı. Hasta ve kontrol grubu bireylerinden alınan periferik kanlar -20°C'de çalışma gününe kadar muhafaza edildi.

Araştırmaya katılan çalışma ve kontrol grubu bireylerinin kanları gönüllülük esasına dayanarak etik kurallar çerçevesinde toplanmıştır. Hem hasta hem de kontrol grubundaki gönüllüler, çalışmaya katılmadan önce çalışmanın amacı ve içeriği hakkında açık bir dille bilgilendirilmiştir.

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Balcalı Hastanesinde Pediatri Onkoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada real-time PCR metodu kullanılmıştır.

4.1. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkimesi

Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (RT-PCR, real-time polymerase chain reaction) temeli polimeraz zincirleme tepkimesine dayanan, DNA moleküllerini çoğaltmaya ve eş zamanlı olarak miktarını ölçmek için sıklıkla kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Bu tekniğe nicel gerçek zamanlı polimeraz zincirleme tepkimesi (qPCR - quantitative real time polymerase chain reaction) ya da kinetik polimeraz zincirleme tepkimesi denilmektedir. RT-PCR'ı iyi anlayabilmek için öncelikle PCR (polimeraz zincirleme tepkimesi) iyi anlaşılmalıdır.

PCR, tek ya da az sayıda DNA molekülünü kopyalama yoluyla milyonlarca kopya haline getirmek için kullanılan yarı-nicel bir tekniktir. PCR, sırasıyla ve mükerrer olarak, ısıyla DNA moleküllerinin birbirinden ayrılması ve tekrar soğutularak primer denilen diziyeye özel küçük DNA parçalarının (oligonükleotidler) tepkimeyi başlatması sonucu, DNA'nın kopyalanması esasına dayanır.

Bir PCR tepkimesi çift sarmallı DNA molekülünün 95°C'ye ısıtılarak sarmalın çözülmesi ile başlar. Daha sonra, ısıyı 50–60°C düşürerek çoğaltılmak istenen DNA dizisinin 3' uçlarına özel olarak tasarlanan sentetik oligonükleotidlerin DNA'ya bağlanması sağlanır. Tepkime tüpünde bulunan deoksinükleotidler (dNTP) ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimi ile yeni DNA molekülünün sentezlenmesi için kullanılırlar. Bu enzim kaplıca gibi sıcak kaynak sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterilerinden elde edilir. Bu enzim ısı tekrar 95 °C çıkarıldığında dahi yapısını korur ve 72 °C kadar olan sıcaklıkta katalitik olarak görev yapabilir. Sentez işlemi bitince tepkime tüpü tekrar 95 °C çıkarılır ve bütün işlem tekrarlanır. Bu tekrarlama işlemi sonucunda istenilen DNA dizisi kopyalanmış ve yaklaşık 20 döngü sonunda tek bir DNA molekülünün bir milyondan fazla kopyası yapılmış olur. Bu işlem sırasında kopyalanması istenilmeyen DNA dizileri kopyalanmaz ve tek kopya halinde kalırlar.

Bütün tepkime işlemi sonrasında, DNA molekülleri etidyum bromit içeren akrilamid jellere yüklenir ve boyutlarına göre ayrılır. Bu sayede kopyalanmış DNA molekülleri görüntülenebilir. Bütün tepkime tüplerindeki örnekler aynı işlemde

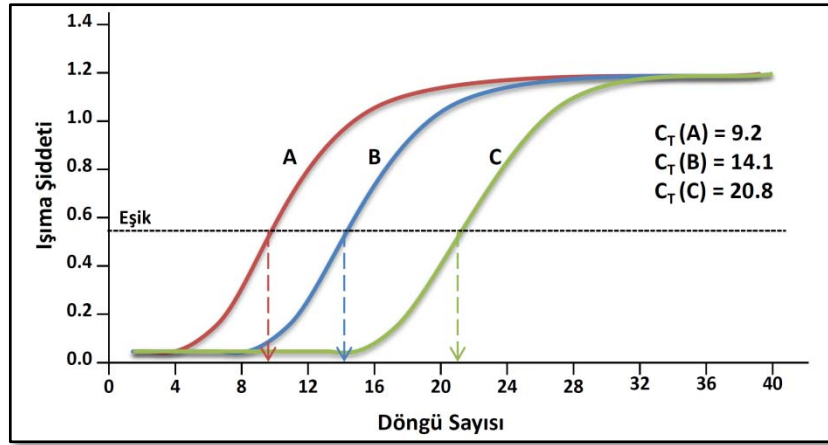
geçtikleri için, akrilamid jel üzerinde farklı DNA bant büyüklükleri, örnekler arasında farklı DNA miktarı olduğunu bu da bize başlangıçta örnek tüplerinde istenilen DNA miktarlarının farklı olduğunu belirtir. Böylece farklı örnekler birbirlerine göre değerlendirilmiş olurlar. Ancak, PCR yönteminin dezavantajlarından biri döngü sayısı arttıkça örneklerin kopyalanmasında DNA miktarının plato denilen doymuşluk seviyesine ulaşması ve akrilamid jel üzerinde yorum yapmayı zorlaştırmasıdır. Bu doymuşluk seviyesi sorununu aşabilmek için her döngüden sonra DNA miktarının gerçek zamanlı olarak ölçüldüğü RT-PCR tekniği gibi teknikler kullanılmaktadır.

RT-PCR, her PCR döngüsünden sonra tepkime tüplerindeki DNA miktarının akrilamid jellere gerek kalmadan ölçülmesi temeline dayanan karmaşık ve sıklıkla kullanılan bir tekniktir. RT-PCR ihtiyaçlar doğrultusunda tasarlanmış gelişmiş bir PCR yöntemidir. RT-PCR'ın PCR'a göre daha avantajlı olmasının sebeplerinden biri de, PCR'da gerek duyulan nanogram (10^{-9} g) seviyesindeki başlangıç materyaline oranla pikogram (10^{-12} g) ve hatta femtogram (10^{-15} g) seviyelerindeki başlangıç materyalleriyle de kullanılabilmesidir. Bu hassasiyet özelliği RT-PCR'da etidyum bromit yerine kullanılan ışınır (floresan) moleküllerden kaynaklanır.

Son yıllarda, gerçek zamanlı DNA sentezinin görüntülenmesi amacıyla farklı ışınır moleküller geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bunlar arasında yüksek hassasiyet ve kolay kullanım kapasiteli SYBR Green molekülü öne çıkanlardan birisidir. SYBR Green, çift sarmallı DNA moleküllerine bağlanması sonucu belli dalga boyunda uyarılarak yine belli dalga boylarında ışımaya yapar. Tepkimede döngü sayısı ilerledikçe daha fazla çift sarmallı DNA molekülü sentezlendiği için daha fazla SYBR Green DNA'ya bağlanır ve daha fazla ışımaya yapar. Her döngü sayısından sonraki DNA miktarı aynı zamanda başlangıçta tüplerde bulunan DNA miktarıyla doğru orantılıdır. Her döngü sonunda tepkime tüplerindeki ışımaya miktarını ölçerek, tüplerdeki çift sarmallı DNA moleküllerinin miktarını da belirlemiş oluruz.

Bu zincirleme tepkimelerinde RT-PCR makineleri kullanılır. Bu makineler aynı anda hem DNA miktarını çoğaltırlar hem de ışımaya miktarını ölçerler. Bünyesinde hem bir thermal cycler (içinde tepkime tüplerinin yerleştirildiği ve hızlıca ısıtılan ve soğutulan ısı bloğu bulunduran cihaz, bu sayede DNA kopyalanmasını sağlar) hem de bir fluorimeter (farklı dalgaboylarında ışık üreterek tüplerdeki molekülleri uyarabilen – bu örnekte SYBR Green- ve aynı zamanda uyarılan moleküllerin yaptığı farklı

dalgaboylarındaki ışığı ölçebilen cihaz) bulundurur. Bu cihazın yapılan ışığı ölçebilmesinin bir eşik değeri vardır. Bu eşik değerinin altındaki bütün sinyaller yokmuş gibi değerlendirilir. Zincirleme tepkimesi ilerledikçe, bu eşik değerine daha erken döngülerde (düşük döngü sayısı) ulaşan örnekler, başlangıç örneğinde daha çok istenilen DNA dizisinin varlığını belirtir. Bu değere döngü eşiği (C_T – cycle threshold) değeri denir (bkz. Şekil 11). C_T değeri, eşik değerine ulaşılması için gereken döngü sayısı olarak tanımlanır. C_T değeri başlangıç örneğinde bulunan DNA miktarıyla ters orantılıdır. Başka bir ifadeyle küçük C_T değeri daha büyük başlangıç materyali anlamına gelir.



Şekil 11. Hayali bir RT-PCR sonucu grafiği. A, B ve C örneklerinin C_T değerleri gösterilmiştir

RT-PCR sonuçlarını değerlendirmek için iki yöntem vardır, görece ya da karşılaştırmalı (relative ya da comparative) ve mutlak (absolute) değerlendirme.

Görece değerlendirme, bir çok örneğin deney içi kontrol seviyesine göre normalize edilmesi sonucu örneklerdeki istenilen DNA yada mRNA miktarının örnekler arasındaki azlık ya da çokluk durumunu belirler. Deney içi kontrol olarak kullanılan diziler genelde bütün örneklerde eşit miktarda olduğu bilinen ve aynı tüp ya da ayrı bir tüpte yine PCR ile çoğaltılan nükleik asitlerdir. Dolayısıyla, görece değerlendirme yapılırken konsantrasyonu bilinen bir standart örneğinin kullanılmasına gerek kalmaz. Görece değerlendirme gen anlatımı seviyesindeki fizyolojik değişimlerin ölçülmesi için yeterli seviyede bir değerlendirme değildir. Tekrar edecek olursak, görece değerlendirme farklı örneklerdeki istenilen DNA dizisinin C_T değerlerinin eşit seviyedeki bir deney içi

kontrole göre normalize edilmesi esasına dayanır. Bu değerlendirme örnekler arasında azlık ya da çokluk; ya da katlar cinsinden sonuç verir (*örneğin, bir örnekte istenilen DNA dizisi miktarı diğer örnektekinin 5 katıdır*). Görece değerlendirme C_T değerleri kullanılarak aşağıdaki formülle hesaplanır (bu hayali hesaplama Şekil 10’da bulunan C_T değerlerine ek olarak A ve B örneklerindeki deney içi kontrol genlerinin C_T değerlerinin sırasıyla 6.3 ve 6.2 olduğu kabul edilerek yapılmıştır):

Katlı Anlatım Seviyesi = 2	$-((C_{TA} - C_{TAHK}) - (C_{TB} - C_{TBHK}))$	C_{TA} = A örneği C_T değeri C_{TAHK} = A örneği deney içi kontrol C_T değeri
Katlı Anlatım Seviyesi = 2	$-((9.2-6.3)-(14.1-6.4)) = 27.86$	C_{TB} = B örneği C_T değeri C_{TBHK} = B örneği deney içi kontrol C_T değeri

Şekil 12. RT-PCR sonucunun görece değerlendirmesi için kullanılan formül

Bu normalize edilmiş hayali hesaplama sonucu, A örneğinde istenilen DNA miktarının B örneğine göre 27.86 kat fazla olduğu görülebilir.

Mutlak değerlendirme, DNA konsantrasyonu kesin olarak bilinen örneklerin standart doğrusu yapmak için kullanılması ile yapılır. Bir örneğin C_T değerinin bu standart doğrusundaki değerlere göre incelenmesiyle örnekte bulunan DNA miktarının mutlak değeri hesaplanır. Standart doğrular hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmekte kullanılabilirler. Ancak, bu standart doğruların oluşturulması sırasında son derece hassas ve özenli davranılmalıdır. Çünkü RT-PCR örneklerinin mutlak değerinin belirlenmesi bu doğrulara bağlıdır. Bu değerlendirme yöntemi, örnekte bulunan kesin DNA miktarını belirler (örneğin; ilgilenilen DNA miktarı bir örnekte 6.4 pikogram diğer bir örnekte de 1 pikogram vardır).

RT-PCR laboratuvarlarda bir çok amaçla kullanılırlar. Sıklıkla tanısal ve temel araştırma yapmak için kullanılır. Tanısal amaçla RT-PCR, belirli enfeksiyonel hastalıklara, kansere ya da genetik bozukluklara sebep olduğu bilinen nükleik asit seviyelerinin belirlenmesi için kullanılır. Araştırma amaçlı olarak ise, gen anlatım seviyelerinin belirlenmesi için kullanılır. Örnek olarak, belirli bir genin anlatım seviyesinin gelişme süresince ya da hücre döngüsünde, kullanılan farmakolojik ilaçlara

göre tepki olarak, çevresel faktörlere bağlı olarak ya da hücre farklılaşması sürecinde ne yönde değiştiğinin tespitinde kullanılabilir.

RT-PCR'da başlangıç materyali olarak RNA, genomik DNA ya da plasmid DNA'sı kullanılabilir. Herhangi bir RNA (mRNA, rRNA, mikroRNA) kullanılacağı takdirde, RNA'nın önce ters-transkripsiyon tepkimesi işlemiyle tümleyicisi olan DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesi gerekir. Yakın zamanda, bu işlemin yapılmasına gerek bırakmayan ters-transkripsiyonlu gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) kitleri piyasaya sürülmüştür.

4.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

- High püre miRNA izolasyon kiti
- miRCURY universal cDNA sentez kiti
- Bağlanma tamponu (binding buffer)
- Bağlanma kuvvetlendirici (binding enhancer)
- Yıkama solüsyonu (Wash buffer)
- Elüsyon tamponu (elution buffer)
- Filtreli tüpler
- Atık tüpleri
- 1,5 ml eppendorfler
- 200 µl ve 1000µl pipet ve pipet uçları
- 13.000g çalışabilen eppendorf santrifüjü

Paxgene blood RNA latter tüpünün içerisinde -20°C de saklı tam kandan 150 µl. alınarak içerisine 312 µl binding buffer ve 200 µl binding enhancer eklendi. Kan filtreli tüpe aktarıldıktan sonra 13.000g de 45 sn. santrifüje edildi. Daha sonra üzerine 500 µl wash buffer eklendi. 13.000g de 30 sn. santrifüje edildi. Üzerine 300 µl wash buffer eklendi. 13.000 g de 30 sn. santrifüje edildi. Daha sonra 1 dk. Santrifüje edildi. Daha sonra filtreli tüpler eppendorf tüplerinin içine kondu. İçerisine 75 µl elution buffer eklenerek 13.000 g de 1 dk. Santrifüje edildi. Ve total RNA eldesi yapıldı.

4.2.1. Universal Komplementer DNA Sentez Kiti

Sentetik spike-in liyofilize halde bulunmakta olup 40 µl PCR grade water ile sulandırıldı. Çalışma öncesi 15 dk. buz üzerinde tutuldu.

4.2.2. Komplementer DNA Yapımı İçin Karışım Protokolü

Elde edilen RNA'ların Komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesi için miRCURY universal cDNA sentez kiti kullanıldı. Sentezin gerçekleşmesi için gerekli olan bileşenler, 5x reaksiyon buffer, Nükleaz free water, Enzyme mix, Sentetik spike-in olarak üretici firmanın miRCURY universal cDNA sentez kiti için hazırlamış olduğu kılavuzdaki tavsiyelere uyularak gerekli hacimlerde hazırlanarak oluşturuldu. Oluşturulan cDNA sentez mix'inin 16 ul'lik hacmine elde edilen total RNA'lardan 4'er ul eklenerek Total Volume hazırlandı.

Tablo 2. Komplementer DNA Yapımı İçin Karışım Protokolü

5x reaksiyon buffer	4 µl
Nükleaz free water	9 µl
Enzyme mix	2 µl
Sentetik spike-in	1 µl
Total RNA	4 µl (5ng/µl)
Total Volume	20 µl

4.2.3. Komplementer DNA Yapımı İçin Isı Protokolü

Hazırlanan cDNA sentez mix ve RNA karışımları yine üretici firmanın miRCURY universal cDNA sentez kiti için hazırlamış olduğu kılavuzda ki tavsiyelerine uyularak aşağıda ki ısı ve sürelerde işlem görmek üzere Light Cyler 480 sistemine ait 96 kuyucuklu plate üzerine yüklendi.

- 42 °C de 60 dk.
- 95 °C de 5 dk.
- +4 °C de saklama veya -20 °C de saklama

Uygulanan protokol sonrasında cDNA'lar elde edildi.. Elde edilen cDNA lar PCR aşaması öncesi 1:80 oranında PCR grade water ile seyreltildi. Hazırlanan karışımlar Light Cyler 480 sistemine ait 96 kuyucuklu plate üzerine yüklendi. SNORD48 PCR primer mix 220 µl nükleaz free water ile sulandırıldı. Hsa-miR-122 PCR Primer mixler ise 110 ar µl nükleaz free water ile sulandırıldı.

4.2.4. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Housekeeping gen/ Referans gen)

cDNA'ların referans gen açısından amplifikasyonunu sağlamak ve ilgili bölgeleri işaretlemek amacıyla SYBR Green Master Mix ve SNORD48 Pcr Primer Mix'leri üretici firmanın tavsiyelerine uyularak aşağıdaki protokole göre hazırlandı.

Tablo 3. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Housekeeping gen/ Referans gen)

SYBR Green Master Mix	5µl
SNORD48 PCR Primer mix	1µl
1/80 sulandırılmış cDNA	4µl
Total Volume	10µl

4.2.5. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Target gen/Hedef gen)

cDNA'ların hedef gen açısından amplifikasyonunu sağlamak ve ilgili bölgeleri işaretlemek amacıyla SYBR Green Master Mix, Hsa-miR-122 PCR Primer Mix (forward) ve Hsa-miR-122 PCR Primer Mix'leri (reverse) üretici firmanın tavsiyelerine uyularak aşağıda ki protokole göre hazırlandı.

Tablo 4. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Target gen/Hedef gen)

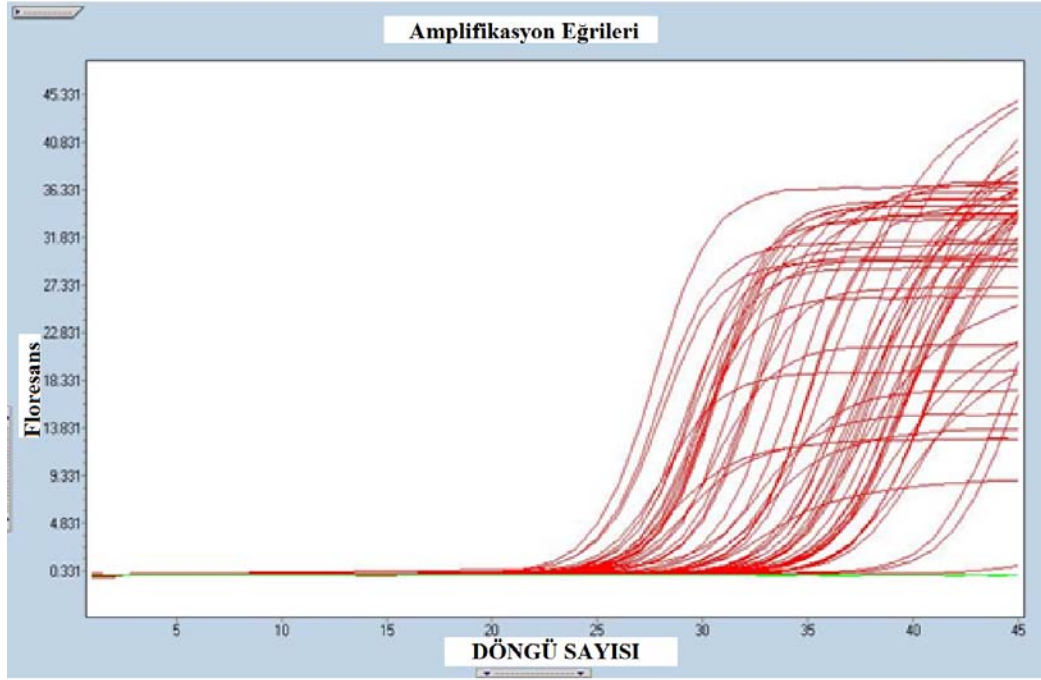
SYBR Green Master Mix	5 µl
Hsa-miR-122 PCR Primer Mix (Forward)	0,5 µl
Hsa-miR- 122 PCR Primer Mix (Reverse)	0,5 µl
1/80 sulandırılmış cDNA	4µl
Total volüm	10 µl

4.2.6. Gerçek Zamanlı PCR Isı Protokolü

Hazırlanan Referans Gen Real Time PCR Mix'leri ve Hedef Gen Real Time PCR Mix'leri uygun cDNA'lar ile Light Cycler 480 Sistemine ait 96 kuyucuklu plate'ler üzerinde biraraya getirildikten sonra aşağıda ki Isı Protokolü ile Light Cycler 480 Sisteminde Gerçek Zamanlı PCR için işleme alındı.

Tablo 5. Gerçek Zamanlı PCR Isı Protokolü

Denaturasyon	95°C de 10 dk.
Amplifikasyon Bu döngü 45 kez sağlanır.(45 cycle, Ramp-rite 1,6°C/sn, saniyedeki ısı değişimi)	95°C de 10 sn. 60°C de 1 dk. Okuma
Erime eğrisi	95°C de 30 sn. 40 °C de 1 dk. 85 °C de continue (Acquisitions 3 per/°C)
Soğutma	40 °C de 1 dk.



Şekil 13. Hasta ve kontrollere ait amplifikasyon eğrileri

4.3. İstatistiksel Metod

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 17.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki Kare test ya da Fisher test istatistiği kullanıldı. Gruplar arasında sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında dağılımlar kontrol edildi, değişken sayısına göre normal dağılım göstermeyen parametrelere de Mann Whitney U testi yada Kruscal Wallis testi kullanıldı. Çalışmada hasta ve kontrol grupları baz alınarak Mir122 ekspresyonu için sensitivite (duyarlılık) ve spesifite (özgüllük) değerleri hesaplanarak

ve ROC eğrisi altında kalan alan incelenerek cut off değeri belirlendi. MiR-122 ekspresyonuna göre değişkenler arası korelasyon için Spearman korelasyon testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

5. BULGULAR

Tablo 6. Hasta ve Kontrol Grubu Karşılaştırması

	Hasta	Kontrol	Toplam	p
Cinsiyet				
Erkek	36(80,0)	36(80,0)	72(80,0)	
Kadın	9(20,0)	9(20,0)	18(20,0)	0,604
Siroz				
Var	37(86,0)	0(0,0)	37(42,0)	
Yok	6(14,0)	45(100,0)	51(58,0)	0,0001
Hepatit	2,4±2,1	4±0		0,0001
AFP	1375,2±7361,9	0,7±0,4		0,0001
AST	109,7±143,8	21,2±7,5		0,0001
ALT	61,6±79,6	18,9±9,1		0,0001
PTZ	15,2±2,6	13,1±6,2		0,0001
INR	1,3±0,2	1,1±0,6		0,0001

Hasta grubunda toplam 43, kontrol grubunda toplam 43 kişi mevcuttu. Ancak 2 hastanın karaciğer nakli yapılmadan önce ve yapıldıktan sonraki kan örnekleri dikkate alınırca çalışma için her grupta 45'er örnek mevcuttu. Kontrol grubundaki örnekler hastalarla aynı yaş ve cinsiyette, hepatit markerları negatif, transaminazları ve koagülasyon markerları normal, ultrasonografide karaciğer ekojenitesi normal ve içerisinde solid/heterojen kitle barındırmayan hastalardan seçildi. Ve kontrol grubunun sağlıklı seçildiği istatistiki olarak gösterildi. Tablo 6'da hasta ve kontrol grubundaki çalışmanın kriterleri karşılaştırılmış olup sağlama yapılmıştır. Buna göre her iki grupta da yaş ve cinsiyet açısından fark yoktur. Her hastanın karşısına aynı yaş ve cinsiyetteki kontroller koyulmuştur. Kontrol grubu siroz olmayan sağlıklı hastalardan seçilmiş ve her iki gruptaki fark tabloda istatistiki olarak gösterilmiştir. ($p<0,0001$). Kontrol grubundaki hiçbir hastanın hepatiti olmayıp sağlıklı hastalardan seçilmiştir. ($P<0,0001$) (Değerlendirmedeki 4 rakamı SPSS verilerini gireerkenki kodlama olup 4 sağlıklı bireylere ait hepatit kodudur.) Aynı şekilde hastaların AFP, AST, ALT, PTZ, INR değerleri hasta ve kontrol grubunda belirgin olarak farklıdır. ($P<0,0001$)

Tablo 7. Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Dağılımı

	Ort±SS	Medyan	Minimum	Maksimum
Yaş	62,7±9,9	62	23	79
AFP	672,324±5161,6	1,45	0,1	48402
AST	64,466±109,5	29,5	9	680
ALT	39,83±59,7	26,5	7	488
ALBUMIN	3,144±0,6	3,2	1,9	4,6
PTZ	14,146±4,8	12,97	10,6	52,4
INR	1,222±0,4	1,13	0,9	4,7
Ca	8,982±0,7	9	7,3	12,3
HCT	35,18±6,1	36,2	22	46,8
PLT	232,861±161,8	206	21,8	985
FERRITIN	340,483±664,2	75	5,2	3308
CRP	2,5467±4,7	0,896	0,1	31
Serum miR-122 düzeyi	0,017552±0,041	0,003455	0	0,262

Tablo 7’de hasta ve kontrol grubunun demografik verileri ortalama, medyan, minimum ve maksimum değerleri ile gösterilmiştir.

Tablo 8. Hasta Grubunun Tanımlayıcı İstatistikleri

	n	%
Child		
A	18	41,9
B	17	39,5
C	8	18,6
Tümör Çapı		
<2 cm	3	7,0
2-5 cm.	20	46,5
3.>5 cm	20	46,5
Nodül		
Tek	21	48,8
Multi	18	41,9
Diffüz	4	9,3
Vasküler İnvazyon		
Yok	29	67,4
Var	14	32,6
Asit		
Yok	20	46,5
Var	23	53,5
Doku Tanısı		
Yok	28	65
Var	15	35
Tip 2 DM		
Yok	36	80,0
Var	9	20,0
BCLC	n	%
A1	1	2
A2	4	9
A3	5	11
A4	1	2
B	12	27
C	13	30
D	7	16
Hepatit		
HBV	26	60
HCV	9	20
HBV+HCV	1	2
HBV+HDV	1	2
Non-viral	9	20
HBeAg		
pozitif	3	11
negatif	23	89

Tablo 9. Hasta Grubunun Tümör Boyutu, MELD Skoru, Bilirubin ve AFP Değerleri

	N	Ort±SS	Minimum	Maksimum
Tümör boyutu	43	61,5±46,9mm	10mm	200mm
MELD	43	12,9±5,0	7	34
Bilirubin	43	2,6±3,6	3	18,9
AFP	43	1375,2±7361,9	1	48402

Tablo 10. Hasta ve Kontrol Grubunun Laboratuvar Verileri ve Serum miR-122 Düzeylerinin Karşılaştırılması

	Hasta		Kontrol		p
	Ort±SS	Med(Min-Max)	Ort±SS	Med(Min-Max)	
Yaş	62,6±9,9	62(23-79)	62,8±9,9	61(23-79)	0,904
AST	109,7±143,8	62(20-680)	21,2±7,5	20(9-41)	0,0001
ALT	61,6±79,6	41(18-488)	18,9±9,1	18(7-39)	0,0001
Albümin	3,1±0,6	3,2(1,9-4,1)	3,2±0,5	3,3(2,2-4,6)	0,247
PTZ	15,2±2,6	14,9(10,7-24,2)	13,1±6,2	11,8(10,6-52,4)	0,0001
INR	1,3±0,2	1,3(0,9-2,3)	1,1±0,6	1,1(0,9-4,7)	0,0001
Ca++	8,9±0,9	8,9(7,6-12,3)	9,1±0,6	9(7,3-10,1)	0,030
HCT	35,2±6,6	36,1(22-46,8)	35,2±5,6	36,3(23,2-45,5)	0,957
PLT	161,6±159,9	123(51-985)	300,9±132,9	302(21,8-556)	0,0001
Ferritin	313,1±458,5	101,25(6,5-1963)	364,1±806,8	60,3(5,2-3308)	1,000
CRP	2,8±3,5	1,43(0,13-13,8)	2,4±5,5	0,839(0,1-31)	0,048
Serum miR-122 düzeyi	0,030173±0,053	0,00943(0-0,262)	0,00493±0,015	0,0017(0-0,1)	0,0001

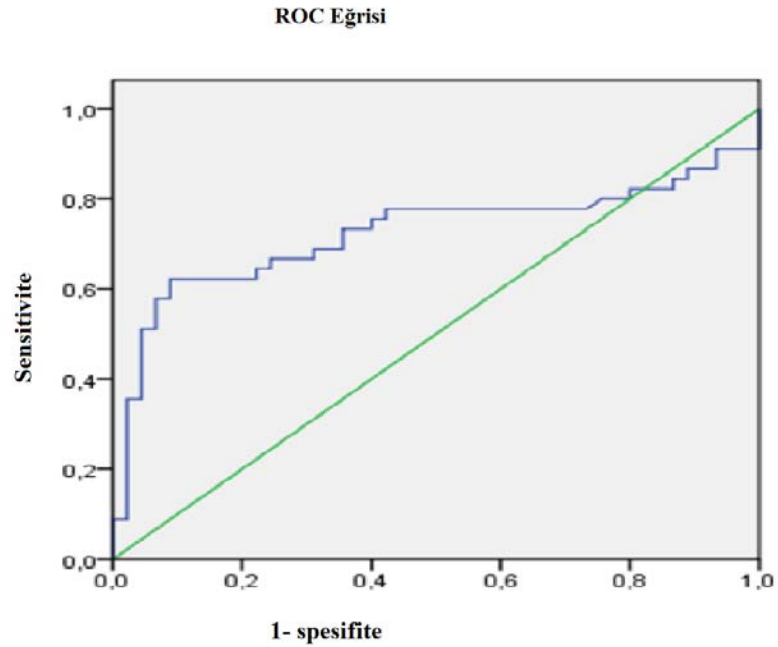
Tablo 10’da hasta ve kontrol grubuna ait laboratuvar verileri ve serum miR-122 değerleri görülmektedir. Her iki grupta da çalışma düzeni gereği yaş ve cinsiyet farkı yoktu.(p:0,904) Hastaların ortalama AST değeri 109,7 μ /ml, ALT değeri ise 61,6 idi. Kontrol grubu ile belirgin farklı saptandı. (p<0.0001) Hasta ve kontrol grubunun albümin değerleri arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılık saptanmadı. (p: 0,247) Hasta ve kontrol grubunda koagülasyon markerları arasında belirgin farklılık saptandı. (p<0.0001). Hasta grubunun koagülasyon markerlarından Protrombin zamanı ve INR değeri anlamlı olarak daha yüksekti. Hasta ve kontrol grubunda trombosit (PLT) değerleri arasında anlamlı farklılık saptandı. (p<0.0001) Hasta grubunun trombositleri anlamlı olarak daha düşük bulundu. Hasta grubunun C-reaktif protein (CRP) düzeyi kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ve istatistiki olarak anlamlı idi.(p<0.05) Ancak hasta ve kontrol grubunun kalsiyum, hematokrit ve ferritin değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

HSK’lı hasta grubunun serum miR-122 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu.(hasta grubu ort.: 0,030173±0,053, kontrol grubu ort.: 0,00493±0,015, p<0.0001)

MiR-122 İçin Cut-off Değer Belirlenmesi

Çalışmada hasta ve kontrol grupları baz alınarak serum miR-122 için sensitivite (duyarlılık) ve spesivite (özgüllük) değerleri hesaplandı ve ROC eğrisi altında kalan alan incelenerek cut off değer belirlendi.

ROC eğrisi altında kalan alana göre (0,724) hasta grubunda miR-122 için cut-off değer belirlendi. Bu eğri ve altında kalan değere göre tablo 11’de ortada koyu harfle gösterilen 2 değerin üzerinde kalan serum miR-122 düzeyi % 66-68 sensitivite ve % 68-75 spesivite ile hepatoselüler kanser hastaları için anlamlı kabul edilebilecektir.



şekil 14. ROC eğrisi altında kalan alan (AUC) 0,724 p=0,0001

Tablo 11. miR-122 İçin Cut-Off Değer Seçimi

MİR122 değeri	Sensitive (duyarlılık)	Spesivite (özgüllük)
,002745	,756	0,600
,002940	,733	0,644
,003455	,689	0,689
,003840	,667	0,756
,004085	,644	0,778
,005990	,622	0,911

Tablo 12. Spearman Korelasyon Tablosu

		BCLC	MELD	Bilurubin	AFP
Serum miR-122 düzeyi	r	-0,02	0,13	0,07	0,19
	p	0,886	0,382	0,624	0,198
BCLC	r		,35*	,51**	,41**
	p		0,017	0,0001	0,005
MELD	r			,65**	0,27
	p			0,0001	0,07
Bilurubin	r				,38**
	p				0,009
AFP					

r= korelasyon katsayısı

Hasta grubuna ait klinik özellikler, evrelemeler ve laboratuvar değerleri değişkenleri arası korelasyonu göstermek için Spearman korelasyon testi kullanıldı.(Tablo 12) Bu testin sonucunda hastaların BCLC evreleri (p:0,886), MELD skorları (p:0,382), bilirubin değerleri (p:0,624), AFP değerleri (p:0,198) ve serum miR-122 düzeyi arasında istatistiki açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı. Ancak hastaların BCLC sınıfları, MELD skorları, bilirubin ve AFP değerlerinin her biri kendi aralarında istatistiki olarak anlamlı düzeylerde ilişkili bulundu.

Tablo 13. Serum miR-122 Düzeyinin Hastaların Demografik Verileri ile İlişkisi

	Mir122 ekspresyon					p
	N	Ort±SS	Median	Min.	Max.	
Cinsiyet						
Erkek	36	0,023164±0,031	0,00864	,0000	,1062	0,080
Kadın	9	0,058209±0,011	0,01080	,0001	,2620	
HbeAg						
Pozitif	3	0,039610±0,038	0,02630	,0094	,0831	0,757
Negatif	23	0,029499±0,055	0,00782	,0000	,2620	
Siroz						
Var	39	0,034396±±0,56	0,01150	,0000	,2620	0,182
Yok	6	0,002722±0,003	0,00220	,0000	,0078	
Child						
A		0,043635±0,064	0,01150	,0000	,2620	0,152
B		0,011135±0,014	0,00678	,0000	,0493	
C		0,041038±0,073	0,01275	,0000	,2182	
Tümör Çapı						
<2 cm	4	0,010770±0,011	0,00839	,0000	,0263	0,699
2-5 cm.	21	0,028665±0,051	0,00784	,0000	,2182	
.>5 cm	20	0,035637±0,061	0,01012	,0000	,2620	
Vasküler İnvazyon						
Yok	31	0,030401±0,047	0,01150	,0000	,2182	0,967
Var	14	0,029668±0,068	0,00566	,0001	,2620	
Asit						
Yok	21	0,038159±0,061	0,00943	,0000	,2620	0,357
Var	24	0,023185±0,047	0,00839	,0000	,2182	
Doku Tanısı						
Yok	30	0,034067±0,62	0,00992	,0000	,2620	0,499
Var	15	0,022385±0,027	0,00784	,0000	,1005	
AFP-grup						
<400	37	0,032286±0,058	0,00784	,0000	,2620	0,577
>400	8	0,020402±0,021	0,00992	,0000	,0493	
Tip 2 DM						
Yok	36	0,033814±0,059	0,00863	,0000	,2620	0,370
Var	9	0,015610±0,013	0,01340	,0000	,0445	

Tablo 13’de hastaların laboratuvar değerleri, klinik verileri, evrelendirmeleri ve serum miR-122 düzeyleri arasındaki ilişki gösterilmiştir. Kadın hastaların miR-122 düzeyi erkek hastalara göre daha yüksek bulunmuştur ancak istatistiki olarak anlam saptanamamıştır. (K:0,058209±0,011 > E: 0,023164±0,031, p: 0,080) Bu fark olası kadın ve erkek hastaların dağılım düzeninden kaynaklanmaktadır. (E:36, K: 9)

HBV’nin viral replikasyon düzeyini göstermekte anlamlı olan HBeAg pozitif olan grupta serum miR-122 düzeyi negatif olanlara göre daha yüksek saptanmıştır. Ancak istatistiki olarak anlamlı fark saptanamamıştır. (0,039610±0,038> 0,029499±0,055, p: 0,757)

Hastaların Child-Pugh evresi ve serum miR-122 düzeyleri karşılaştırılmış. Ancak evreler arasında serum miR-122 düzeyinde artma ya da azalma gibi bir korelasyon saptanamamış, istatistiki açıdan anlamlı fark bulunamamıştır. (P: 0,152)

Aynı değerlendirme hastaların tümör çapı ve serum miR-122 düzeyleri arasında yapılmış. Ve tümör çapı artışı ya da azalışı ile serum miR-122 düzeyi arasında istatistiki olarak anlamlı fark saptanamamıştır. (p: 0,699)

Vasküler invazyonu olan hastaların serum miR-122 düzeyi olmayanlara göre kıyaslanmış, ancak istatistiki olarak anlamlı fark saptanamamıştır. (p: 0,967)

Asiti olan/olmayan hastalar, doku tanısı olan/ olmayan hastalar, Tip 2 diabetes mellitusu olan ve olmayan hastalar, AFP değeri 400 ng/ml'nin üzerinde olan ve olmayan hastaların serum miR-122 düzeyleri gruplar içerisinde karşılaştırılmış ancak üç grupta da istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanamamıştır. (p: 0,357, p: 0,499, p: 0,577, p:0,370)

Tablo 14. Karaciğer Nakli Öncesi ve Sonrası Serum miR-122 Düzeyleri

	Hasta 1	Hasta 2
Karaciğer nakli öncesi serum miR-122 düzeyi	0.0511	0.00638
Karaciğer nakli sonrası serum miR-122 düzeyi	0.00784	0

Tablo 14'de karaciğer nakline giden iki hepatoselüler kanserli hastanın nakil öncesi ve nakilden sonraki serum miR-122 düzeyleri gözlenmektedir. Her iki hastanın da nakil sonrasında serum miR-122 değerleri azalmıştır.

Tablo 15. Hepatit B Enfeksiyonu Olan ve Non-Viral Örneklerin Serum miR-122 Düzeyi İlişkisi

	N	Ort±SS miR-122 ekspresyon düzeyi	Median miR-122 ekspresyon düzeyi	Minimum miR-122 ekspresyon düzeyi	Maximum miR-122 ekspresyon düzeyi	p
HBV	26	0,0457±0,066	0,0136	0,0	0,262	0,0001
Non-viral	55	0,0060±0,014	0,0025	0,0	0,100	
Total	81	0,0187±0,043	0,0035	0,0	0,262	

Tablo 15’de HBV’si olan hastalar ile viral hepatit/hepatiti olmayan hastaların serum miR-122 düzeyleri karşılaştırılmış. Ve HBV enfeksiyonu olan hastaların serum miR-122 düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. ($p < 0,0001$)

Tablo 16. Hepatit C Enfeksiyonu Olan ve Non-Viral Örneklerin Serum miR-122 Düzeyi İlişkisi

	N	Ort±SS Serum miR-122 düzeyi	Median Serum miR-122 düzeyi	Minimum Serum miR-122 düzeyi	Maximum Serum miR-122 düzeyi	p
HCV	9	0,0065±0,008	0,00303	0,0	0,217	0,929
Non-viral	55	0,0061±0,014	0,0025	0,0	0,100	

Tablo 16’da HCV’si olan hastalar ile viral hepatit/hepatiti olmayan hastaların serum miR-122 düzeyleri karşılaştırılmıştır. HCV enfeksiyonu olan hastaların serum miR-122 düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Ancak istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanamamıştır. ($0,0065 \pm 0,008 > 0,0061 \pm 0,014$, $p: 0,929$)

Tablo 17. Viral Hepatiti Olan ve Olmayanlar Arasındaki Serum miR-122 Düzeyi İlişkisi

	N	Ort±SS Serum miR-122 düzeyi	Median Serum miR-122 düzeyi	Minimum Serum miR-122 düzeyi	Maximum Serum miR-122 düzeyi	p
Viral hepatit	35	0,0356±0,0596	0,0104	0,0	0,262	0,0001
Non- viral	55	0,0061±0,014	0,0025	0,0	0,100	

Tablo 17’de viral hepatiti olan ve olmayan hastaların serum miR-122 düzeyleri karşılaştırılmış. Ve serum miR-122 düzeyi viral hepatiti olan hastalarda olmayanlara göre istatistiki olarak belirgin daha yüksek saptanmıştır. ($p < 0,0001$)

Tablo 18. Serum miR-122 Düzeyi -HBV DNA Düzeyi İlişkisi

	N	Ort±SS Serum miR-122 düzeyi	Median Serum miR- 122 düzeyi	Minimum Serum miR- 122 düzeyi	Maximum Serum miR- 122 düzeyi	p
HBV DNA						
<2.000 IU/ml	14	0,0262±0,031	0,0125	0,000	0,092	0,105
>2.000 IU/ml	12	0,0685±0,088	0,0354	0,0001	0,262	

Tablo 18’de HBV-DNA düzeyi ile serum miR-122 düzeyi arasındaki ilişkiye bakılmıştır. HBV-DNA’sı yüksek olan hastaların serum miR-122 düzeyi daha yüksek bulunmuştur ancak istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanamamıştır. ($0,0685 \pm 0,088 > 0,0262 \pm 0,031$, p: 0,105)

Tablo 19. Serum miR-122 Düzeyi – HbsAg Kantitasyonu İlişkisi

	N	Ort±SS Serum miR-122 düzeyi	Median Serum miR-122 düzeyi	Minimum Serum miR-122 düzeyi	Maximum Serum miR-122 düzeyi	p
HBsAg						
<3.500 s/co	7	,0298±0,037	,0094	0,00	0,101	0,482
>3.500 s/co	18	,0540±0,76	,0201	0,00	0,262	

Tablo 19’da hastaların hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) kantitasyonu ile serum miR-122 düzeyleri arasındaki ilişkiye bakılmıştır. HBsAg kantitasyonu daha yüksek olanların serum miR-122 düzeyi daha yüksek bulunmuştur. Ancak istatistiki açıdan anlamlı farklılık saptanamamıştır. ($0,0540 \pm 0,76 > 0,0298 \pm 0,037$, p: 0,482).

Tablo 20. Serum miR-122 Düzeyi – Alanin Aminotransferaz (ALT) İlişkisi

	N	Ort±SS Serum miR-122 düzeyi	Median Serum miR- 122 düzeyi	Minimum Serum miR- 122 düzeyi	Maximum Serum miR-122 düzeyi	p
ALT						
<35 IU/ml	58	0,0139±0,035	0,00238	0,00	0,218	0,235
>35 IU/ml	28	0,0249±0,051	0,00745	0,00	0,262	

Tablo 20'de alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri ile serum miR-122 düzeyleri karşılaştırılmıştır. ALT düzeyi daha yüksek olanlarda serum miR-122 düzeyi daha yüksek saptanmış ancak istatistik olarak anlamlı farklılık saptanamamıştır. (0,0249±0,051>0,0139±0,035, p: 0,235)

6. TARTIŞMA

Primer karaciğer kanseri tüm dünyada 5. en sık gözlenen kanser olup, en yaygın görülen kanserler arasında mortalitede üçüncü sıradadır¹. Hepatosellüler kanser primer karaciğer kanserlerinin % 85- 90 lık bir kısmını oluşturmaktadır².

HSK ile ilgili bilinen en belirgin faktörler hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), kronik alkol kullanımı, aflatoksinle kontamine olmuş gıda alımıdır. HSK gelişim riski yüksek kişileri biyomarkerlarla erken hastalık evresinde tanımlayabilmek için bir çok çalışma yapılmıştır. Ancak hepatoselüler karsinomun erken saptanabilmesi için henüz saptanabilmiş güvenilir bir biyomarker yoktur. Alfa-fetoprotein hepatoselüler karsinomu teşhis edebilmek için kullanılmış ancak sensitivite ve spesifivite düşük olduğu için sonuçları çok memnun edici olmamıştır¹⁹⁰. Bu yüzden geçtiğimiz yıllarda hepatoselüler karsinom için hastalığın erken safhasını gösterebilen ve güvenilir bir biyomarker saptamak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır.

MicroRNA'lar hayvanlar ve bitkilerde yeni tanımlanmış, selüler proliferasyon, farklılaşma ve apoptoziste geniş biyolojik etkileri olan, protein kodlu olmayan, tek zincirli, 20-22 nükleotidli bir dizi negatif gen regülatörüdür. Tüm genlerin içerisinde % 1-4'lük bir yer kapladığı için microRNAlar gen regülatörlerinin içerisindeki büyük gruplardan birisidir¹³⁴⁻¹³⁶.

MicroRNA ve malignitelerle ilgili yapılmış birçok çalışmada malignitelerin gelişim ve progresyonunda farklı miRNA ekspresyon profillerine ulaşılmıştır¹⁹¹⁻¹⁹⁵. Hepatoselüler karsinom ve miRNAlarla ilgili tümör ve yanındaki normal karaciğer dokusundan yapılan birçok çalışmada farklı miRNA ekspresyon profilleri gözlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda miR-10b, miR-18, miR-20, miR-221, miR-222 ve miR-224'ün tümör dokusunda arttığı görülürken, miR-122, miR-145, miR-150, miR-199a, miR-199b, miR-200b, miR-214 ve miR-223'ün ise tümörlü dokuda düzeyinin azaldığı gözlenmiştir^{154,196}. Bu microRNA'ların her biri hepatokarsinogeneze önemli rol oynamaktadır.

miR-122 karaciğere spesifik bir miRNA'dır ve dokuda miR-122'nin kaybı hepatoselüler karsinomun malign fenotip kazanmasına eşlik eder^{13,197,198}.

Serum ya da plazmada ölçülebilen miRNA'lar kanser tanı ve prognozunu belirlemede yeni biyomarkerlar gibi gözükmemektedir¹⁸⁹. Yakın zamanda akciğer^{199,200},

prostat²⁰¹, kolorektal²⁰², over²⁰³ ve meme²⁰⁴ kanserlerinde serumda saptanıp tanı ve prognostik kriter olarak kullanılabilen miRNA'larla ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Ancak hepatoselüler karsinomla ilgili serumda saptanabilen miRNA'larla yapılan çalışma sayısı çok sınırlıdır.

Jian Xu, Chen Wu ve arkadaşlarının²⁰⁵ yaptığı çalışmada kronik hepatitli ve hepatoselüler karsinomlu hastalarda serumda saptanabilen miR-21, miR-122 ve miR-223 düzeylerinde bakılmış ve bakılan üç miRNA düzeyinin de hem hepatoselüler karsinomlu olgularda hem de kronik hepatit B'li olgularda sağlıklı kontrol hastalarına göre serum düzeyleri yüksek saptanmıştır. Qi ve arkadaşlarının²⁰⁶ yaptığı vaka kontrollü prospektif çalışmada 48 hepatoselüler karsinomlu, 48 HCC'si olmayan HBV'li hasta ve 24 kontrol hastasında serumda miR-122 düzeylerine bakılmış ve hem hepatitli hem de hepatoselüler karsinomlu hastalarda serum miR-122 sağlıklı kontrollere göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda da hepatoselüler kanserli hastaların serum miR-122 değerini kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksek saptadık. ($0,030173 \pm 0,053 > 0,00493 \pm 0,015$, $P < 0,0001$). Ve bu istatistiki fark göz önünde bulundurularak hepatoselüler karsinomlu hastaların serum miR-122 değeri için ROC eğrisi oluşturuldu. Eğri altında kalan değere göre serum miR-122 düzeyi 0,003840 değerinin üzerinde olan hastalarda % 68,9 sensitivite ve % 75,6 spesifite ile hepatoselüler karsinomdan şüphe edilecektir. Bu değer Jian Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada % 71 sensitivite ve % 86 spesifiteye, Qi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise % 81,6 sensitivite ve % 83,3 spesifiteye sahiptir.

Ancak diğer çalışmalarda da bizim çalışmamızda da hepatoselüler karsinomlu hastaların çoğuna eşlik eden hastalık kronik viral hepatit olduğundan serumda saptanan yüksek miR-122 değerinin karaciğer hasarına bağlı olduğu düşünülmektedir¹⁸⁶⁻¹⁸⁸.

MiR-122 karaciğere spesifik bir miRNA olduğundan başka nedenlere bağlı karaciğer hastalığı dışlandığında kronik hepatit ve hepatoselüler karsinomda yeni potansiyel bir marker olabilir¹⁶¹.

HSK'lı hastalarda doku düzeyinde yapılan çalışmalarda kanserli dokudaki miR-122 ve miR-223'ün bitişik normal karaciğer dokusuna göre belirgin azalmış olduğu gözlenmiştir^{13,176-178,198,207}. Literatürdeki birçok çalışma doku düzeyinde yapılmıştır.

Bizim çalışmamızda miR-122 serumda bakılmıştır. Ve hepatoselüler kanserli hastaların serum miR-122'si sağlıklı kontrollerden yüksek saptanmıştır. Bu durumun olası nedeninin hepatositlerin içerisinde bol miktarda bulunan miR-122'nin viral hepatit ya da karaciğer kanseri gibi hepatosit hasarı ile giden durumlarda dolaşıma yüksek miktarda karışması olduğu düşünülmektedir. Serumdaki miRNA'lar çok stabil olduğundan¹⁷⁷ hasarlı hepatositlerden kana miRNA kaçağının olması hepatoselüler karsinomlu hastaların tümör dokusundaki düşüklüğünün ve dolaşımdaki yüksekliğinin izahı olabilir. Wang ve arkadaşları ile Laterza ve arkadaşlarının yaptığı iki hayvan modeli çalışmada da fare karaciğerinde oluşturulan doku hasarından sonra miR-122 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir^{186,188}.

MiRNA'ların doku hasarı ile arttığını gösteren benzeri çalışmalar myokardial hasar ve akut myokard infarktüsünde miR-208 ve miR-1 kan düzeylerinin arttığını göstermiştir^{208,209}.

Karaciğerdeki hasta/nekroinflamasyonlu doku arttıkça dolaşan miR-122'nin artabileceği düşüncesiyle çalışmamızda hastaların tümör çapı ve serum miR-122 düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ancak tümör çapı ile serum miR-122 düzeyi arasında istatistiki olarak anlamlı fark saptanamamıştır. (p: 0,699) Hepatoselüler karsinomlu hastalarda literatürde artan ya da azalan tümör çapı ile serum miR-122 düzeyi arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma mevcut değildir.

Çalışmamızda hepatoselüler kanserli 2 hastaya karaciğer transplantı yapılmış, hastaların karaciğer transplantı öncesinde ve sonrasında serum miR-122 düzeylerine bakmak amacıyla örnek alınmıştır. Gerçek zamanlı PCR'da hastaların nakil öncesi ve nakil sonrası örneklerinin karşısına aynı kontrol konulmuştur. Her iki hastanın da nakil sonrasında serumdaki miR-122 değerleri belirgin ölçüde gerilemiştir. Bu durum kanserli hastadaki hasarlı dokudan salınan miR-122'nin yeni hasarsız karaciğerden daha az salındığının bir göstergesi olabileceği gibi örnek sayısı iki ile sınırlı olduğundan tesadüfi bir durum da olabilir. Örnek sayısının arttırılacağı çalışmalarla bu bilgi güçlendirilebilir. Ve bu bilgi eğer doğru ise yakın gelecekte donörün karaciğeri nakil öncesi süreçte hepatosit hasarını önceden tespit etmek adına miR-122 düzeyi ile taranabilir. Literatürde bu veya bu bilgiye benzer içerikli çalışma bulunamamıştır.

Zhang Y. ve arkadaşlarının²¹⁰ ve Bihrer V. ve arkadaşlarının²¹¹ yapmış olduğu çalışmalarda karaciğerde nekroinflamasyonla giden alkolik hepatit ve kronik viral

hepatitli hastaların alanin aminotransferaz (ALT) artışı ile serum miR-122 düzeyi arasında korelasyon bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri ile serum miR-122 düzeyleri karşılaştırılmıştır. ALT düzeyi daha yüksek olanlarda serum miR-122 düzeyi daha yüksek saptanmış ancak istatistik olarak anlamlı farklılık saptanamamıştır. ($0,0249 \pm 0,051 > 0,0139 \pm 0,035$, p: 0,235)

Hepatoselüler karsinomda vasküler invazyonun kötü prognozla ilişkisi bilinmektedir²¹². Wei-Chih ve arkadaşlarının¹⁹⁸ çalışmasında karaciğer dokusundaki miR-122'nin intrahepatik metastazları düzenlediği ve metastazı olan HSK'luların miR-122 düzeyinin daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda vasküler invazyonu olan hepatoselüler karsinomlu hastaların serum miR-122 düzeyi olmayanlara göre kıyaslanmış, ancak istatistik olarak anlamlı fark saptanamamıştır. (p:0,967) Literatürde portal venöz invazyonla serumda saptanabilen miR-122 düzeyi arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma mevcut değildir.

Çalışmamızda hepatoselüler kanserli hastaların klinik evreleri ve diğer malignite göstergeleri serum miR-122 düzeyleri ile karşılaştırılmıştır. Klinik evrelerin kendi arasındaki ilişkileri ve her birinin serum miR-122 düzeyi ile olan ilişkisini göstermek amacıyla Spearman korelasyon testi kullanıldı. Tüm klinik evrelendirmeler kendi aralarında istatistik düzeyde uyumlu idi. Ancak bu değerlendirme sonucunda hastaların BCLC evreleri (p:0,886), MELD skorları (p:0,382), Child-Pugh evresi (P: 0,152) ve serum miR-122 düzeyi arasında istatistik açıdan anlamlı bir farklılık saptanamadı. Literatürde hastaların klinik evrelendirme skorları ile serum miR-122 arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma bulunamamıştır.

Kentaro Kojima ve arkadaşlarının²¹³ yaptığı çalışmada miR-122'nin AFP ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda AFP ve serum miR-122 düzeyi arasında istatistik düzeyde anlamlı ilişki bulunamamıştır.(p:0,198)

Qiu L ve arkadaşlarının²¹⁴ yapmış olduğu çalışmada doku düzeyindeki miR-122 artışının hepatit B yüzey ve zarf antijeni yapımını azalttığını göstermişlerdir. Buna karşılık Zhang ve arkadaşları²⁰⁵ ile Xu j ve arkadaşlarının²¹⁰ yaptıkları vaka kontrollü prospektif çalışmalarda hepatit B hastalığı olan hastaların serum miR-122 düzeylerini artmış olarak bulmuşlardır. Waidmann ve arkadaşlarının²¹⁵ kronik hepatit B'li hastalarda yaptığı çalışmada serum miR-122 ile ALT, HBV DNA ve HBsAg arasında

anlamli iliŒki saptamiŒlardır. Serum ALT, HBV DNA ve HBsAg (IU/mL) düzeyleri arttıkça serum miR-122 düzeyinde artıŒ bulunmuŒlardır.

Bizim alıŒmamızdaki hepatoselüler kanser hastalarının 26'sında farklı evrelerde kronik B viral hepatiti mevcuttu. alıŒmada HBV'si olan hastalar ile viral hepatit/hepatiti olmayan hastaların serum miR-122 düzeyleri karŒılaŒtırıldı. Ve HBV enfeksiyonu olan hastaların serum miR-122 düzeyi anlamlı olarak daha yüksek bulunmuŒtur. ($p < 0,0001$)

alıŒmamızda HBV'nin viral replikasyon düzeyini göstermekte anlamlı olan HBeAg pozitif olan grupta serum miR-122 düzeyi, HBeAg negatif olanlara göre daha yüksek saptanmıŒtır. Ancak istatistiki olarak anlamlı fark saptanamamıŒtır. ($0,039610 \pm 0,038 > 0,029499 \pm 0,055$, $p: 0,757$)

alıŒmamızda HBV-DNA düzeyi ile serum miR-122 düzeyi arasındaki iliŒkiye bakılmıŒtır. HBV-DNA'sı yüksek olan hastaların serum miR-122 düzeyi daha yüksek bulunmuŒtur ancak istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanamamıŒtır. ($0,0685 \pm 0,088 > 0,0262 \pm 0,031$, $p: 0,105$)

alıŒmamızda Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) kantitasyonu ile serum miR-122 düzeyleri arasındaki iliŒkiye bakılmıŒtır. HBsAg kantitasyonu daha yüksek olanların serum miR-122 düzeyi daha yüksek bulunmuŒtur. Ancak istatistiki açıdan anlamlı farklılık saptanamamıŒtır. ($0,0540 \pm 0,76 > 0,0298 \pm 0,037$, $p: 0,482$)

Hepatit B enfeksiyonundaki rolünün aksine dokudaki miR-122 HCV replikasyonu için önemlidir. Dokudaki miR-122 HBV replikasyonunu baskılamakten, HCV replikasyonunu aktive etmektedir. R.K. Jangra ve arkadaŒlarının yapmıŒ olduğu alıŒmada miR-122'nin HCV genomunun 5'ucundaki iki bağlanma bölgesine yerleŒerek HCV replikasyonunu arttırdığı gsterilmiŒtir. Y. Shan ve arkadaŒları²¹⁶ miR-122'yi antagomiR ile suprese etmenin HCV replikasyonunu baskıladığını gstermiŒtir. I.M. Pedersen ve arkadaŒlarının²¹⁷ yaptığı alıŒmada ise interferon-β tedavisinin miR-122 ekspresyonunu azaltarak da HCV replikasyonunu baskıladığını gstermiŒtir.

M. Sarasin ve arkadaŒlarının²¹⁸ ve K. Morita ve arkadaŒlarının²¹⁹ alıŒmalarında, HCV viral yükü ile doku miR-122 düzeyi arasında iliŒki bulunamamıŒtır.

V. Bihrer ve arkadaŒlarının, S. Cermelli ve arkadaŒlarının yaptığı alıŒmalarda serum miR-122 değerinin hepatik nekroinflamasyonun diğer indirek göstergeleri olan AST ve ALT değerleri ile korele olarak yüksek olduğunu gstermiŒlerdir.

Çalışmamızda da HCV'si olan hastalar ile viral hepatit/hepatiti olmayan hastaların serum miR-122 düzeyleri karşılaştırılmıştır. HCV enfeksiyonu olan hastaların serum miR-122 düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Ancak istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanamamıştır. ($0,0065 \pm 0,008 > 0,0061 \pm 0,014$, p: 0,929) HCV'li hastalarımızın serum miR-122 değerleri ile AST/ALT değerleri arasında anlamlı istatistiki fark saptanamamıştır.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hepatoselüler karsinomlu hastalar ve sağlıklı kontrollerle yapılan bu çalışmada her iki grupta da serum miR-122 değerlerine bakılmış ve hepatoselüler kanserli hastalarda serum miR-122 düzeyi anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur.($p<0.0001$)

Çalışmamızda HSK'lı hastalarda anlamlı çıkan serum miR-122 düzeyi ile ROC eğrisi elde edilmiştir. Ve eğri altında kalan alan hesabıyla bu çalışma sonucunda belirtilen cut-off değerinin üstündeki değer % 68 sensitivite ve % 75 spesifite ile sağlıklı hastaları hastalardan ayırd edecektir. Ancak miR-122'nin karaciğere spesifik olduğu bilinse de hepatoselüler karsinomlu hastalar için spesifitesi yoktur. Çalışmalarda karaciğerde nekroinflamasyonla giden diğer durumlarda da arttığı gösterilmiştir. Konu ile ilgili daha ayrıntılı bilgi edinebilmek için hepatoselüler karsinomlu, kronik hepatitli ve sağlıklı kontrollerin karşılaştırmalarının olduğu büyük çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatürde kronik hepatit B'li ve kronik hepatit C'li hastalarda serum miR-122 değerlerinin arttığı gösterilmiştir. Çalışmamızdaki hepatoselüler karsinomlu hastaların çoğunluğunun (34/43) viral hepatit olduğundan gruplara ayırarak da miR-122 değerlerine bakılmıştır. Ancak bu hastalarda miR-122'nin HSK'ya mı yoksa viral hepatite mi bağlı yükseldiği bilinemez. Bunun için hepatoselüler karsinomu olmadığı bilinen kronik viral hepatitli hastalara ihtiyaç vardır.

Literatürde yapılan çalışmaların önderliğinde miR-122'nin hepatoselüler karsinomda doku düzeyinde azaldığı, serum düzeyinde ise belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Ancak bunun nasıl olduğu kesin olarak bilinmemektedir.

MicroRNA'ların yakın dönemde yeni ve iyi biyomarkerlar olarak rutin kullanıma geçeceği düşünülmektedir. miR-122'nin iyi bir biyomarker olabilmesi için büyük çaplı çalışmalara ihtiyacı vardır. Ancak şu dönemde hastanın kendi serum miR-122 değeri viral hepatit, hepatoselüler karsinom, karaciğer tümör rezeksiyonu ya da karaciğer transplantı gibi durumlarda tedavi öncesi ve sonrasında; ameliyat öncesi ve sonrasında alınan kontrollerle karaciğerdeki nekroinflamasyonun giderildiğinin ciddi bir göstergesi olabilir. Bizim çalışmamızda hepatoselüler karsinomlu 2 hastaya karaciğer transplantasyonu yapılmış, hastaların ameliyat öncesi ve sonrasında miR-122 değerlerine bakılmıştır. Her iki hastanın da miR-122 düzeyleri azalmıştır. Bu konuda

daha fazla hasta sayısıyla yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır. miR-122 tek başına hepatoselüler karsinomada tanı, prognoz ve surveyansı göstermede iyi bir biyomarker olmayabilir. Diğer tanısal, klinik, prognostik göstergelerle birlikte kullanılması daha anlamlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. **Parkin DM.** Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* **2001**;2:533–543.
2. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis, reviews in basic and clinical gastroenterology, *j.gastro.* **2007**.04.061
3. **Parkin DM.** Cancer Incidence in five continents. IARC scientific publications volume VIII [No. 155]. **2002.** Lyon: IARCPress.
4. **American Cancer Society. Cancer Facts and FIGS 2005.** *American Cancer Society* [online], <http://www.cancer.org/docroot/home/index.asp> (**2005**).
5. **Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment** *Paraskevi A. Farazi and Ronald A. DePinho*, www.nature.com/reviews/cancer, doi:10.1038/nrc1934,**2006**
6. **Badvie, S.** Hepatocellular carcinoma. *Postgrad. Med.J.* **76**, 4–11 (**2000**).
7. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer Aurora Esquela-Kerscher and Frank J. Slack, nature reviews cancerdoi:10.1038/nrc1840,**2006**
8. **Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 116, 281–297 (**2004**). An excellent review of plant and animal miRNAs that discusses how miRNAs differ from siRNAs.
9. **Morita K, Taketomi A, Shirabe K, et al.** Clinical significance and potential of hepatic microRNA-122 expression in hepatitis C. *Liver Int* **2011**; 31: 474–84.
10. **Chang J, Nicolas E, Marks D, et al.** miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* **2004**; 1:106–13.
11. **Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, et al.** miR-122, a mammalian liverspecific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* **2004**; 1:106-13; PMID: 17179747; <http://dx.doi.org/10.4161/rna.1.2.1066>
12. **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: 1577–81.
13. **Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS.** Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* **2009**;28: 3526–36.
14. **Wu X, Wu S, Tong L, et al.** miR-122 affects the viability and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Scand J Gastroenterol* **2009**;44: 1332–9.
15. **Ma L, Liu J, Shen J, et al.** Expression of miR-122 mediated by adenoviral vector induces apoptosis and cell cycle arrest of cancer cells. *Cancer Biol Ther* **2010**; 9: 554–61.
16. **Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al.** Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **2007**; 67: 6092–9.
17. **Lin CJ, Gong HY, Tseng HC, Wang WL, Wu JL.** miR-122 targets an anti-apoptotic gene, Bcl-w, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**; 375: 315–20.

18. **Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, et al.** Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* **2004**;127(Suppl 1):S35–S50.
19. **McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB, et al.** Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigenpositive Alaska native carriers. *Arch Intern Med* **1990**;150:1051–1054.
20. **Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK.** Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol* **2004**;38(10 Suppl 3):S158–S168.
21. **Chang MH.** Hepatitis B virus and cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* **2011**;188:75–84.
22. **Fattovich G, Bortolotti F, Donato F.** Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol* **2008**;48:335–352.
23. **Yang JD, Kim WR, Coelho R, et al.** Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2011**;9:64–70.
24. **Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al.** Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **2002**;347:168–174.
25. **Chen JD, Yang HI, Iloeje UH, et al.** Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology* **2010**;138:1747–1754.
26. **Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al.** Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* **2004**;351:1521–1531.
27. **Shi Y, Wu YH, Wei W, et al.** Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma: a metaanalysis. *Liver Int* **2012**;32:231–240.
28. **Wong DK, Huang FY, Lai CL, et al.** Occult hepatitis B infection and HBV replicative activity in patients with cryptogenic cause of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2011**;54:829–836.
29. **Goodgame B, Shaheen NJ, Galanko J, et al.** The risk of end stage liver disease and hepatocellular carcinoma among persons infected with hepatitis C virus: publication bias? *Am J Gastroenterol* **2003**;98:2535–2542.
30. **Lee MH, Yang HI, Lu SN, et al.** Hepatitis C virus seromarkers and subsequent risk of hepatocellular carcinoma: long-term predictors from a community-based cohort study. *J Clin Oncol* **2010**;28:4587–4593.
31. **Kramer JR, Giordano TP, El-Serag HB.** Effect of human immunodeficiency virus and antiretrovirals on outcomes of hepatitis C: a systematic review from an epidemiologic perspective. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2007**;5:1321–1328.
32. **Modi AA, Feld JJ, Park Y, et al.** Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology* **2010**;51: 201–209.
33. **Bravi F, Bosetti C, Tavani A, et al.** Coffee drinking and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Hepatology* **2007**;46:430–435.
34. **Larsson SC, Wolk A.** Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* **2007**;132:1740–1745.
35. **Huxley R, Lee CM, Barzi F, et al.** Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analysis. *Arch Intern Med* **2009**;169: 2053–2063.

36. Yuan JM, Ross RK, Stanczyk FZ, et al. A cohort study of serum testosterone and hepatocellular carcinoma in Shanghai, China. *Int J Cancer* **1995**;63:491–493.
37. Chiu CM, Yeh SH, Chen PJ, et al. Hepatitis B virus X protein enhances androgen receptor-responsive gene expression depending on androgen level. *Proc Natl Acad Sci USA* **2007**; 104:2571–2578.
38. Yeh SH, Chen PJ. Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. *Oncology* **2010**;78(Suppl 1):172–179.
39. Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **1998**;75:347–354.
40. Shi J, Zhu L, Liu S, et al. A meta-analysis of case-control studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China. *Br J Cancer* **2005**;92: 607–612.
41. Cho LY, Yang JJ, Ko KP, et al. Coinfection of hepatitis B and C viruses and risk of hepatocellular carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* **2011**;128:176–184.
42. Hutchinson SJ, Bird SM, Goldberg DJ. Influence of alcohol on the progression of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2005**;3:1150–1159.
43. Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* **2002**;155:323–331.
44. Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, et al. Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation of 2215 patients. *J Hepatol* **1998**; 28:930–938.
45. Chuang SC, Lee YC, Hashibe M, et al. Interaction between cigarette smoking and hepatitis B and C virus infection on the risk of liver cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2010**;19:1261–1268.
46. Garner RC, Miller EC, Miller JA. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B 1 to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530. *Cancer Res* **1972**;32:2058–2066.
47. Bressac B, Kew M, Wands J, et al. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* **1991**;350:429–431.
48. Turner PC, Sylla A, Diallo MS, et al. The role of aflatoxins and hepatitis viruses in the etiopathogenesis of hepatocellular carcinoma: a basis for primary prevention in Guinea-Conakry, West Africa. *J Gastroenterol Hepatol* **2002**;17(Suppl):S441–S448.
49. El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2006**;4:369–380.
50. Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* **2002**;36:1206–1213.
51. El-Serag HB, Richardson PA, Everhart JE. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States veterans. *Am J Gastroenterol* **2001**;96:2462–2467.
52. Chao LT, Wu CF, Sung FY, et al. Insulin, glucose and hepatocellular carcinoma risk in male hepatitis B carriers: results from 17-year follow-up of a population-based cohort. *Carcinogenesis* **2011**;32:876–881.

53. **Hassan MM, Spitz MR, Thomas MB, et al.** The association of family history of liver cancer with hepatocellular carcinoma: a case-control study in the United States. *J Hepatol* **2009**;50:334–341.
54. **Yu MW, Chang HC, Liaw YF, et al.** Familial risk of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers and their relatives. *J Natl Cancer Inst* **2000**;92:1159–1164.
55. **Guo YM, Wei WY, Shen XZ.** Tumour necrosis factor 308 polymorphisms and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Hepatogastroenterology* **2010**;57:926–931.
56. **Qin H, Liu B, Shi T, et al.** Tumour necrosis factor-alpha polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Int Med Res* **2010**;38:760–768.
57. **Yang Y, Luo C, Feng R, et al.** The TNF-alpha, IL-1B and IL-10 polymorphisms and risk for hepatocellular carcinoma: a metaanalysis. *J Cancer Res Clin Oncol* **2011**;137:947–952.
58. **Wang B, Huang G, Wang D, et al.** Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *J Hepatol* **2010**;53:508–518.
59. **Ozan YAZICI, Kadir BAHAR,** Hepatosellüler Karsinomda Yeni Tanı ve Tedavi Yöntemleri, Güncel Gastroenteroloji 12/1, Mart **2008**, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara
60. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* **1998**; 28: 751-5.
61. **Sugano S, Miyoshi K, Suzuki T, et al.** Intrahepatic arteriovenous shunting due to the hepatocellular carcinoma and cirrhosis, and its change by transcatheter arterial embolization. *Am J Gastroenterol* **1994**; 89: 184-8.
62. **Kew MC, Dos Santos HA, Sherlock S.** Diagnosis of primary cancer of the liver. *Br Med J* **1971**; 4: 408-11.
63. **Chen TH, Chen CJ, Yen MF, et al.** Ultrasound screening and risk factors for death from hepatocellular carcinoma in a high-risk group in Taiwan. *Int J Cancer* **2002**;98:257–261.
64. **Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, et al.** Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* **1993**;328:1797–1801.
65. **Velazquez RF, Rodriguez M, Navascues CA, et al.** Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* **2003**;37:520–527.
66. **Bruix J, Sherman M.** Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2005**;42:1208–1236.
67. **Zhang BH, Yang BH, Tang ZY.** Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **2004**;130:417–422.
68. **Trevisani F, De NS, Rapaccini G, et al.** Semiannual and annual surveillance of cirrhotic patients for hepatocellular carcinoma: effects on cancer stage and patient survival (Italian experience). *Am J Gastroenterol* **2002**;97:734–744.
69. **Zhang B, Yang B.** Combined -fetoprotein testing and ultrasonography as a screening test for primary liver cancer. *J Med Screen* **1999**;6:108–110.
70. **Bolondi L, Sofia S, Siringo S, et al.** Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut* **2001**;48: 251–259.

71. **Collier J, Sherman M.** Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **1998**;27:273–278.
72. **Kim CK, Lim JH, Lee WJ.** Detection of hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules in cirrhotic liver: accuracy of ultrasonography in transplant patients. *J Ultrasound Med* **2001**;20:99–104.
73. **Trevisani F, D’Intino PE, Morselli-Labate AM, et al.** Serum alfa-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol* **2001**;34:570–575.
74. **Sherman M, Peltekian KM, Lee C.** Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology* **1995**;22:432–438.
75. **Trevisani F, D’Intino PE, Caraceni P, et al.** Etiologic factors and clinical presentation of hepatocellular carcinoma. Differences between cirrhotic and noncirrhotic Italian patients. *Cancer* **1995**;75:2220–2232.
76. **Bayati N, Silverman AL, Gordon SC.** Serum α -fetoprotein levels and liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* **1998**;93:2452–2456.
77. **Franca AV, Elias JJ, Lima BL, et al.** Diagnosis, staging and treatment of hepatocellular carcinoma. *Braz J Med Biol Res* **2004**;37:1689–1705.
78. **Choi D, Kim SH, Lim JH, et al.** Detection of hepatocellular carcinoma: combined T2-weighted and dynamic gadolinium-enhanced MRI versus combined CT during arterial portography and CT hepatic arteriography. *J Comput Assist Tomogr* **2001**;25: 777–785.
79. **Arguedas MR, Chen VK, Eloubeidi MA, et al.** Screening for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C cirrhosis: a cost-utility analysis. *Am J Gastroenterol* **2003**;98:679–690.
80. **Marrero JA, Hussain HK, Nghiem HV, et al.** Improving the prediction of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with an arterially enhancing liver mass. *Liver Transpl* **2005**;11:281–289.
81. **Burrel M, Llovet JM, Ayuso C, et al.** MRI angiography is superior to helical CT for detection of HCC prior to liver transplantation: an explant correlation. *Hepatology* **2003**;38:1034–1042.
82. **de Ledinghen V, Laharie D, Lecesne R, et al.** Detection of nodules in liver cirrhosis: spiral computed tomography or magnetic resonance imaging? A prospective study of 88 nodules in 34 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2002**;14:159–165.
83. **Libbrecht L, Bielen D, Verslype C, et al.** Focal lesions in cirrhotic explant livers: pathological evaluation and accuracy of pretransplantation imaging examinations. *Liver Transpl* **2002**;8:749–761.
84. **Rode A, Bancel B, Douek P, et al.** Small nodule detection in cirrhotic livers: evaluation with US, spiral CT, and MRI and correlation with pathologic examination of explanted liver. *J Comput Assist Tomogr* **2001**;25:327–336.
85. **Ebara M, Ohto M, Watanabe Y, et al.** Diagnosis of small hepatocellular carcinoma: correlation of MR imaging and tumor histologic studies. *Radiology* **1986**;159:371–377.
86. **Bruix J, Sherman M.** Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2005**; 42: 1208-36.
87. **Durand F, Regimbeau JM, Belghiti J, et al.** Assessment of the benefits and risks of percutaneous biopsy before surgical resection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **2001**;35:254–258.

88. **Hashem B. El-Serag, Jorge A. Marrero, Lenhard Rudolph, K. Rajender Reddy**, *Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma*, doi:10.1053/j.gastro.2008.02.090
89. **Ümit AKYILDIZ, Kadir Serkan YALÇIN, F. Cansel TÜRKAY**. Hepatosellüler Karsinom Tedavisi, Fatih Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara, Güncel Gastroenteroloji
90. **Llovet JM, Burroughs A, Bruix J**. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* **2003**; 362: 1907-17.
91. **Llovet JM, Bruix J, Gores GJ**. Surgical resection versus transplantation for early hepatocellular carcinoma: clues for the best strategy. *Hepatology* **2000**; 31: 1019-21.
92. **Yao FY, Ferrell L, Bass NM, et al**. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001; 33: 1394-403. 93. **Llovet JM, Fuster J, Bruix J**. Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* **1999**; 30: 1434-40.
94. **Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S, et al**. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. *Hepatology* **2000**; 32: 1224-9.
95. **Poon RT, Fan ST, Lo CM, et al**. Long-term survival and pattern of recurrence after resection of small hepatocellular carcinoma in patients with preserved liver function: implications for a strategy of salvage transplantation. *Ann Surg* **2002**; 235: 373-82.
96. **Jonas S, Bechstein WO, Steinmuller T, et al**. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Hepatology* **2001**; 33: 1080-6.
97. **Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J**. Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. *Semin Liver Dis* **2010**; 30: 61-74.
98. **Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, et al**. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **2008**; 100: 698- 711.
99. **Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al**. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* **2009**; 10: 25-34.
100. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire. Randomized trial of leuprorelin and flutamide in male patients with hepatocellular carcinoma treated with tamoxifen. *Hepatology* **2004**; 40: 1361-9.
101. **Barbare JC, Bouche O, Bonnetain F, et al**. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with long-acting octreotide: a phase III multicentre, randomised, double blind placebo-controlled study. *Eur J Cancer* **2009**; 45: 1788-97.
102. **Okada S, Okazaki N, Nose H, et al**. Prognostic factors in patients with hepatocellular carcinoma receiving systemic chemotherapy. *Hepatology* **1992**; 16: 112-7.
103. **Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, et al**. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **2008**; 134: 1908-16.
104. **Huo TI, Lin HC, Hsia CY, et al**. The model for end-stage liver disease based cancer staging systems are better prognostic models for hepatocellular carcinoma: a prospective sequential survey. *Am J Gastroenterol* **2007**; 102: 1920-30.

105. **Poon RT, Fan ST, Ng IO, Wong J.** Significance of resection margin in hepatectomy for hepatocellular carcinoma: A critical reappraisal. *Ann Surg* **2000**; 231: 544-51.
106. **Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, et al.** Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg* **2003**; 237: 208-17.
107. **Tanaka H, Hirohashi K, Kubo S, et al.** Preoperative portal vein embolization improves prognosis after right hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with impaired hepatic function. *Br J Surg* **2000**; 87: 879-82.
108. **Mazzaferro V, Romito R, Schiavo M, et al.** Prevention of hepatocellular carcinoma recurrence with alpha-interferon after liver resection in HCV cirrhosis. *Hepatology* **2006**; 44: 1543-54.
109. **Minagawa M, Makuuchi M, Takayama T, Kokudo N.** Selection criteria for repeat hepatectomy in patients with recurrent hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* **2003**; 238: 703-10.
110. **Morimoto O, Nagano H, Sakon M, et al.** Diagnosis of intrahepatic metastasis and multicentric carcinogenesis by microsatellite loss of heterozygosity in patients with multiple and recurrent hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* **2003**; 39: 215-21.
111. **Schwartz JD, Schwartz M, Mandeli J, Sung M.** Neoadjuvant and adjuvant therapy for resectable hepatocellular carcinoma: review of the randomised clinical trials. *Lancet Oncol* **2002**; 3: 593-603.
112. **Sala M, Fuster J, Llovet JM, et al.** High pathological risk of recurrence after surgical resection for hepatocellular carcinoma: an indication for salvage liver transplantation. *Liver Transpl* **2004**; 10: 1294-1300.
113. **Bruix J, Llovet JM.** Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2002**; 35: 519-24.
114. **Freeman RB, Mithoefer A, Ruthazer R, et al.** Optimizing staging for hepatocellular carcinoma before liver transplantation: A retrospective analysis of the UNOS/OPTN database. *Liver Transpl* **2006**; 12: 1504-11.
115. **Llovet JM, Mas X, Aponte JJ, et al.** Cost effectiveness of adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma during the waiting list for liver transplantation. *Gut* **2002**; 50: 123-8.
116. **Trotter JF, Wachs M, Everson GT, Kam I.** Adult-to-adult transplantation of the right hepatic lobe from a living donor. *N Engl J Med* **2002**; 346: 1074-82.
117. **Bruix J, Sherman M, Llovet JM, et al.** Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* **2001**; 35:421-30.
118. **Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, et al.** Small hepatocellular carcinoma: treatment with radio- frequency ablation versus ethanol injection. *Radiology* **1999**; 210: 655-61.
119. **Okada S.** Local ablation therapy for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* **1999**; 19: 323-8.
120. **Livraghi T, Giorgio A, Marin G, et al.** Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* **1995**; 197: 101-8.
121. **Lencioni R, Vignali C, Caramella D, et al.** Transcatheter arterial embolization followed by percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* **1994**; 17: 70-5.

122. **Lencioni RA, Allgaier HP, Cioni D, et al.** Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology* **2003**; 228: 235-40.
123. **Shiina S, Teratani T, Obi S, et al.** A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **2005**; 129: 122-30.
124. **Lin SM, Lin CJ, Lin CC, et al.** Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma < or = 4 cm. *Gastroenterology* **2004**; 127: 1714-23.
125. **Giorgio A, Tarantino L, de Stefano G, et al.** Complications after percutaneous saline-enhanced radiofrequency ablation of liver tumors: 3-year experience with 336 patients at a single center. *AJR Am J Roentgenol* **2005**; 184: 207-11.
126. **Livraghi T, Solbiati L, Meloni MF, et al.** Treatment of focal liver tumors with percutaneous radio-frequency ablation: complications encountered in a multicenter study. *Radiology* **2003**; 226: 441-51.
127. **Livraghi T, Meloni F, Di Stasi M, et al.** Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice? *Hepatology* **2008**; 47: 82-9.
128. **Takayama T, Makuuchi M, Kojiro M, et al.** Early hepatocellular carcinoma: Pathology, imaging, and therapy. *Ann Surg Oncol* **2008**; 15: 972-8.
129. **Bruix J, Sala M, Llovet JM.** Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **2004**; 127: S179-88.
130. **Llovet JM, Bruix J.** Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* **2003**; 37: 429-42.
131. **Kulik LM, Carr BI, Mulcahy MF, et al.** Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis. *Hepatology* **2008**; 47: 71-81.
132. **Yau T, Chan P, Epstein R, Poon RT.** Management of advanced hepatocellular carcinoma in the era of targeted therapy. *Liver Int* **2009**; 29: 10-7.
133. **A.E.Kerscher, F.J.** Slack Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* **2006**; 10.1038/nrc1840
134. **Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B. & Bartel, D. P.** Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540 (2003).
135. **Berezikov, E. et al.** Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 120, 21–24 (2005).
136. **Bentwich, I. et al.** Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature Genet.* 37, 766–770 (2005).
137. **Zaret KS.** Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* **2002**;3:499–512.
138. **Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al.** Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* **2005**;438:685–689.
139. **Ji J, Yamashita T, Budhu A, et al.** Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology* **2009**;50:472–480.

140. Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* **2002**;3:499–512.
141. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **2005**;309:1577–1581.
142. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* **2010**;327:198–201.
143. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* **2011**;141:1572–1585.
144. Baltimore D, Boldin MP, O’Connell RM, et al. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* **2008**;9:839–845.
145. Bala S, Marcos M, Kodys K, et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor {alpha} (TNF{alpha}) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol Chem* **2011**;286:1436–1444.
146. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, et al. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* **2011**;6:e23937.
147. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* **2011**;53:209–218.
148. Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, et al. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**;412:74–79.
149. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, et al. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One* **2011**;6:e16081.
150. Shu J, Kren BT, Xia Z, et al. Genomewide microRNA downregulation as a negative feedback mechanism in the early phases of liver regeneration. *Hepatology* **2011**;54:609–619.
151. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* **2006**;25:2537–2545.
152. Budhu A, Jia HL, Forgues M, et al. Identification of metastasis related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2008**;47:897–907.
153. Jiang J, Gusev Y, Aderca I, et al. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* **2008**;14:419–427.
154. Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, et al. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* **2008**;47:1955–1963.
155. Ding J, Huang S, Wu S, et al. Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI A. *Nat Cell Biol* **2010**;12:390–399.
156. Hou J, Lin L, Zhou W, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* **2011**;19:232–243.
157. Budhu A, Jia HL, Forgues M, et al. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2008**;47:897–907.

- 158. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al.** Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **2007**;67:6092–6099.
- 159. Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, et al.** Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* **2009**;28:3526–3536.
- 160. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J.** Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **2002**; 12:735-9; PMID:12007417; [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00809-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00809-6)
- 161. Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, et al.** miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* **2004**;1:106-13; PMID:21037258; <http://dx.doi.org/10.4161/rna.1.2.1066>
- 162. Li ZY, Xi Y, Zhu WN, Zeng C, Zhang ZQ, Guo ZC, et al.** Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4alpha. *J Hepatol* **2011**; 55:602-11; PMID: 21241755; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2010.12.023>
- 163. Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, et al.** Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev* **2009**; 23:1313-26; PMID:19487572; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1781009>
- 164. Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K, Suzuki T, Kashiwabara S, Baba T.** Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev* **2009**; 23:433-8; PMID:19240131; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1761509>
- 165. Burns DM, D'Ambrogio A, Nottrott S, Richter JD.** CPEB and two poly(A) polymerases control miR-122 stability and p53 mRNA translation. *Nature* **2011**; 473:105-8; PMID:21478871; <http://dx.doi.org/10.1038/>
- 166. Wei-Chih Tsai, Sheng-Da Hsu, Chu-Sui Hsu,** MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis, *J Clin Invest.* **2012**;122(8):2884–2897. doi:10.1172/JCI63455.
- 167. Krützfeldt J, et al.** Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.* **2005**; 438 (7068): 685–689.
- 168. Esau C, et al.** miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* **2006**;3(2):87–98.
- 169. Kim N, Kim H, Jung I, Kim Y, Kim D, Han YM.** Expression profiles of miRNAs in human embryonic stem cells during hepatocyte differentiation. *Hepatol Res.* **2011**;41(2):170–183.
- 170. Gatfield D, et al.** Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev.* **2009**;23(11):1313–1326.
- 171. 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):1577–1581.
- 172. Castoldi M, et al.** The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *J Clin Invest.* **2011**;121(4):1386–1396.
- 173. Cheung O, et al.** Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology.* **2008**;48(6):1810–1820.

174. **Burchard J, et al.** microRNA-122 as a regulator of mitochondrial metabolic gene network in hepatocellular carcinoma. *Mol Syst Biol.* **2010**;6:402.
175. **Chang J, Nicolas E, Marks D, et al.** miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* **2004**; 1:106–13.
176. **Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A.** miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol* **2008**; 48: 648–56.
177. **Kutay H, Bai S, Datta J, et al.** Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem* **2006**; 99: 671–8.
178. **Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al.** Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* **2006**; 25: 2537–45.
179. **Shenouda SK, Alahari SK.** MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* **2009**; 28: 369–78.
180. **Lin CJ, Gong HY, Tseng HC, Wang WL, Wu JL.** miR-122 targets an anti-apoptotic gene, Bcl-w, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**; 375: 315–20.
181. MicroRNA-122 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting Wnt/b-catenin pathway Jie Xu, Xiuming Zhu, DOI:10.1111/j.1478-3231.2011.02750.x, **2012**
182. **Wong CM, Ng IO.** Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* **2008**; 28: 160–74.
183. **Huang CL, Liu D, Ishikawa S, et al.** Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* **2008**; 44: 2680–8.
184. **Katoh M.** Expression and regulation of WNT1 in human cancer: up-regulation of WNT1 by beta-estradiol in MCF-7 cells. *Int J Oncol* **2003**; 22: 209–12.
185. **Lee TH, Tai DI, Cheng CJ, et al.** Enhanced nuclear factor- κ B-associated Wnt-1 expression in hepatitis B- and C-related hepatocarcinogenesis: identification by functional proteomics. *J Biomed Sci* **2006**; 13: 27–39.
186. **Wang K, Zhang S, Marzolf B, et al.** Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **2009**;106:4402–4407.
187. **Yu CH, Xu CF, Li YM.** Association of MicroRNA-223 expression with hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Dig Dis Sci* **2009**;54:2362–2366.
188. **Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, et al.** Plasma micro-RNA as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem* **2009**;55:1977–1983.
189. **Cortez MA, Calin GA.** MicroRNA identification in plasma and serum: A new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther* **2009**;9:703–711.
190. **Zinkin NT, Grall F, Bhaskar K, et al.** Serum proteomics and biomarkers in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Clin Cancer Res* **2008**;14:470–477.
191. **Zhang HH, Wang XJ, Li GX, Yang E, Yang NM.** Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* **2007**;13:2883–2888.

192. **Wu W, Sun M, Zou GM, Chen J.** MicroRNA and cancer: Current status and prospective. *Int J Cancer* **2007**;120:953– 960.
193. **Visone R, Petrocca F, Croce CM.** Micro-RNAs in gastrointestinal and liver disease. *Gastroenterology* **2008**;135: 1866–1869.
194. **Iorio MV, Casalini P, Piovani C, et al.** MicroRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Res* **2009**;69:2195– 2200.
195. **Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, et al.** MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* **2009**;114: 5331–5341.
196. **Varnholt H, Drebber U, Schulze F, et al.** MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2008**;47:1223–1232.
197. **Bai S, Nasser MW, Wang B, et al.** MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem* **2009**;284: 32015–32027.
198. **Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, et al.** MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2009**;49:1571– 1582
199. **Chen X, Ba Y, Ma L, et al.** Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* **2008**;18:997–1006.
200. **Hu Z, Chen X, Zhao Y, et al.** Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **2010**;28:1721–1726.
201. **Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al.** Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**;105:10513–10518.
202. **Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X.** Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* **2010**;127:118– 126.
203. **Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE.** The detection of differentially expressed micro- RNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* **2009**;112:55–59.
204. **Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ.** Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* **2010**;251:499–505.
205. **Jian Xu, Chen Wu, Xu Che, Li Wang, et. al.** Circulating MicroRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in Patients With Hepatocellular Carcinoma or Chronic Hepatitis, *Molecular Carcinogenesis*, Volume 50, Issue 2, pages 136–142, **February 2011**
206. **Qi P, Cheng SQ, Wang H, Li N, Chen YF, Gao CF.** Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *PLoS ONE*. **2011**;6:e28486.
207. **Wong QW, Lung RW, Law PT, et al.** MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology* **2008**;135:257–269.
208. **Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N.** Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* **2009**;55:1944–1949.
209. **Ai J, Zhang R, Li Y, et al.** Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**;391:73–77.

210. **Zhang Y, Jia Y, Zheng R et al.** Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem* **2010**; 56: 1830–1838.
211. **Bihrer V, Friedrich-Rust M, Kronenberger B et al.** Serum miR-122 as a biomarker of necroinflammation in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* **2011**; 106: 1663–1669.
212. **Takizawa D, Kakizaki S, Sohara N.** Hepatocellular Carcinoma with Portal Vein Tumor Thrombosis: Clinical Characteristics, *Prognosis, and Patient Survival Analysis*, doi 10.1007/s10620-007-9808-2, **2007**
213. **Kentaro Kojima, Akemi Takata, Charles Vadnais, Motoyuki Otsuka, Takeshi oshikawa, Masao Akanuma, Yuji Kondo, Young Jun Kang,** MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma, *Nature Communications*, Article number: 338 10.1038/ncomms1345, **2012**
214. **Qiu L, Fan H, Jin W et al.** miR-122- induced down-regulation of HO-1 negatively affects miR-122-mediated suppression of HBV. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**; 398: 771–777.
215. **O. Waidmann, V. Bihrer, T. Pleli, H. Farnik, A. Berger, S. Zeuzem, B. Kronenberger and A. Piiper,** Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection, *Journal of Viral Hepatitis*, **2012**, 19, e58–e65 doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01536.x
216. **Y. Shan, J. Zheng, R.W. Lambrecht, H.L. Bonkovsky,** Reciprocal effects of micro- RNA-122 on expression of heme oxygenase-1 and hepatitis C virus genes in human hepatocytes, *Gastroenterology* **133 (2007)** 1166–1174.
217. **I.M. Pedersen, G. Cheng, S. Wieland, S. Volinia, C.M. Croce, F.V. Chisari, M. David,** Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism, *Nature* **449 (2007)** 919–922.
218. **M. Sarasin-Filipowicz, J. Krol, I. Markiewicz, M.H. Heim, W. Filipowicz,** Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy, *Nat. Med.* **15 (2009)** 31–33.
219. **K. Morita, A. Taketomi, K. Shirabe, K. Umeda, H. Kayashima, M. Ninomiya, H. Uchiyama, Y. Soejima, Y. Maehara,** Clinical significance and potential of hepatic microRNA-122 expression in hepatitis C, *Liver Int.* **31 (2011)** 474–484.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Engin ONAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 25.03.1983 / Mersin
Medeni Durumu : Bekar
Adres : Hacı Ömer Sabancı Caddesi Ömür Apartmanı,
01150 Seyhan /ADANA
Telefon : 0 (533) 424 77 09
E-mail : enginonan@hotmail.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Görev Yeri : Çukurova Üniversitesi
Yabancı Dili : İngilizce