



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**UZUN KODLAMAYAN RNA VE MİKRO RNA'LARIN  
HEPATOSELÜLER KARSİNOMUNUN ERKEN TANISINDA ÖNEMİ**

DUYGU BİRCAN KADIOĞLU  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
PROF. DR. FATİH EREN  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**UZUN KODLAMAYAN RNA VE MİKRO RNA'LARIN  
HEPATOSELÜLER KARSİNOMUNUN ERKEN TANISINDA ÖNEMİ**

DUYGU BİRCAN KADIOĞLU  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
PROF. DR. FATİH EREN  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024

## TEZ ONAYI

---

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Duygu BİRCAN KADIOĞLU

Canım oğluma ve canım kızıma ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından “Uzun Kodlamayan RNA ve Mikro RNA’ların Hepatoselüler Karsinomunun Erken Tanısında Önemi” başlıklı ve “09.2020.1153” numaralı proje ile desteklenmiştir.

“Hayat hiçbirimiz için kolay değil ama ne olacak? Azimli olmalıyız ve her şeyden önce kendimize güvenmeliyiz. Bir konuda yetenekli olduğumuza ve bu şeyin ne pahasına olursa olsun elde edilmesi gerektiğine inanmalıyız.” Marie Curie’nin dediği gibi bu o kadar kolay olmadı ama doktora süresince bilginin gücüne ve sonsuz özverime her zaman inandım. Ancak aşağıda belirtilen kişilerin desteği ve rehberliği olmadan çalışmamı asla sonuçlandıramazdım. Bu nedenle kendilerine en derin minnetlerimi ifade etmek isterim.

Öncelikle doktora eğitimimin ilk gününden itibaren büyük özveri gösteren, ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, öneri ve eleştirileri ile beni daima yönlendiren, bilgi birikimlerini tüm içtenliği ile paylaşan tez danışmanım değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Fatih EREN’e doktora süresince bana yol gösterdiği ve sonsuz desteği için içten teşekkürlerimi sunarım. Miletoslu (Milet) Anaksimandros “Gerçek kahramanlar, kendi zayıflıklarının üstesinden gelmeyi başaranlardır” demiştir ve inanıyorum ki danışman hocam eleştirel denetimiyle kendi zayıf yönlerimi yenmemde bana yardımcı oldu ve daha iyi bir bilimsel karakter geliştirmem için bana yol gösterdi. Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince değerli fikir ve önerilerinden faydalandığım Hocam Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Hocam Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK’e ve tezim süresince tanımaktan çok memnun olduğum, deneylerim sırasında GEMHAM’ın kapılarını bize açan ve her zaman ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli Hocam Prof. Dr. Betül YILMAZ’a ve bu çalışmaya ilişkin değerli tartışmaları ve eleştirel değerlendirmeleri için tüm tez jüri üyelerime teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerini bizimle paylaşan değerli Sayın Hocalarım Prof. Dr. İlter Güney ve Dr. Öğr. Üyesi CAN ERZİK’e en derin minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Doktora kariyerim boyunca, hem bir arkadaş hem de bir hoca olarak destek ve yönlendirmeleriyle her zaman yanımda olan Anabilim Dalı’mızın çiçeği burnunda Öğretim Üyeleri Dr. Öğr. Üyesi Gökçe Güllü AMURAN ve Dr. Öğr. Üyesi İrem PEKER EYÜBOĞLU’na, doktora eğitimim süreci boyunca her zaman desteğini yanımda hissettiğim anabilim dalımızın biyoloğu Sevgili ablam Serap Sevil ŞAHİN’e, bu yolda birlikte yürüdüğüm, inancımı ve kararlılığımı taze tutmama vesile olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yer alan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman benim için en iyiyi ve en güzeli isteyen, beni her daim destekleyen, geleceğimi şekillendirmemde rehber olan sevgili anneme, sevgili babama ve canım eşime; benimle geçireceği vakitlerinden ödün verip, çalışmama mücade eden, farkında olmasalar da varlıklarından güç aldığım canım yavrularım Alparslan ve Zehra'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım, iyi ki varsınız. En iyisiyle de en kötüsüyle de birlikte yüzleştik, gelen her şey sizin desteğinizle çok yumuşak ve güvenli geldi. Hayatın anlamını bilim yoluyla anlamaya ve aramaya çalışıyorum. Ancak bilinen denklemlerin, reaksiyonların veya biyolojik olayların hiçbiri beni tam olarak ikna etmedi. Daha sonra yapbozun son kısmını fark ettim ve Virginia Wolf'un "Hayatın anlamı nedir? Bunların hepsi basit bir soruydu; Yıllar geçtikçe bir noktaya yaklaşma eğiliminde olan büyük vahiy asla gelmemişti. Büyük vahiy belki de hiç gelmedi. Bunun yerine, karanlıkta beklenmedik bir şekilde yanan küçük günlük mucizeler, aydınlanmalar ve kibritler vardı; işte bir tanesi." Bu nedenle aileme teşekkür ediyor, şükranlarımı sunuyorum. Bana sonsuz ve koşulsuz destek veriyorlar; bu süreç boyunca onlar benim gerçek küçük mucizelerimdi.

Anlayışın ve empatinin gücüne inanıyorum ve bu güce sahip insanların etrafta olmasından mutluluk duyuyorum. Hayatımdaki tüm insanlara bana inandıkları için bir kez daha teşekkür etmek istiyorum. Şimdi bilgimizi insanlık ve daha iyi bir dünya için genişletmenin ve tercüme etmenin zamanıdır. Marie Curie'nin bir kez daha söylediği gibi: "Hayatta hiçbir şeyden korkulacak şey yoktur; sadece anlaşılmalıdır. Şimdi daha fazlasını anlamamanın zamanıdır ki, daha az korkalım."

## İÇİNDEKİLER

<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	<b>ii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>iv</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b> .....	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>6</b>
4.1. Karaciğer Kanseri .....	6
4.2. Hepatosellüler Karsinoma .....	7
4.2.1. Hepatosellüler karsinom epidemiyolojisi .....	8
4.2.2. Hepatosellüler karsinoma risk faktörleri .....	10
4.2.3. Hepatosellüler karsinoma patogenezi .....	16
4.2.4. Hepatosellüler karsinoma tanısı.....	19
4.2.5. Hepatosellüler karsinoma tedavisi.....	23
4.2.6. Hepatosellüler karsinoma moleküler biyolojisi.....	26
4.3. Kodlamayan RNA (ncRNA) .....	32
4.3.1. Mikro RNA (miRNA) .....	35
4.3.2. Uzun kodlamayan RNA (lncRNA).....	35
4.4. Hepatosellüler Karsinom'da Kodlamayan RNA'ların Önemi.....	37
4.4.1. miR-146b-5p.....	40
4.4.2. miR-4510.....	45
4.4.3. lncRNA GAS5.....	47
<b>5. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>51</b>
5.1. Hastaların Serum Örneklerinin Toplanması.....	52
5.2. Total RNA'ların Serumdan İzolasyonu .....	52
5.3. İzole Edilen Rnaların Düzeyinin Belirlenmesi .....	54
5.4. MiRNAlar için cDNA Eldesi .....	54
5.5. LncRNAlar için cDNA Eldesi;.....	55
5.6. MiRNAlar için Real Time PCR ile Relatif Kantifikasyon .....	56
5.7. LncRNAlar için Real Time PCR ile Relatif Kantifikasyon .....	58
5.8. HCC'deki miRNA'ların in-siliko Ekspresyon Profili .....	61
5.9. Hedef Genlerin Veri Toplanması ve Tahmini .....	62
5.10. Hedef Gen Yolaklarının Zenginleştirilmesi ve miRNA'ların Ağ Tabanlı Analizi .....	62
5.11. Sağkalım Analizi (Kaplan-Meier Grafiği (KMplot)) .....	63
5.12. İstatistiksel Analiz .....	63

<b>6. BULGULAR</b> .....	<b>64</b>
6.1. Grupların Özelliklerinin Belirlenmesi .....	64
6.2. İzole Edilen RNA'ların Miktarının Belirlenmesi .....	65
6.3. Real-Time PCR ile Relatif Kantitasyon Sonuçları .....	66
6.3.1. Mir-4510 ekspresyon analizi .....	69
6.3.2. Mir-146b-5p ekspresyon analizi .....	70
6.3.3. Lncrna gas5 ekspresyon analizi .....	72
6.4. MiRNA'lar için İn-Siliko Ekspresyon Profili .....	74
6.5. MiRNA'lar için Hedef Genlerin Belirlenmesi .....	76
6.6. MiRNA'ların Ağ Tabanlı Hedef Gen Yolak Zenginleştirilmesi ve Analizi.....	80
6.7.HCC'de miRNA'ların Prognostik Önemi .....	86
6.8. LncRNA Gas5 için İn-Siliko Ekspresyon Analizi.....	87
6.9. QIAGEN IPA İle LncRNA Gas5'in Ağ Tabanlı Hedef Gen Yolak Zenginleştirilmesi ve Analizi .....	89
6.11. HCC'de LncRNA Gas5'in Prognostik Önemi .....	93
<b>7. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>94</b>
<b>8. KAYNAKLAR</b> .....	<b>107</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>136</b>
<b>10. BİLİMSEL FAALİYETLER</b> .....	<b>137</b>
<b>11. EKLER</b> .....	<b>138</b>



## KISALTMALAR LİSTESİ

AFP	:	Alfa Fetoprotein
AKT	:	Protein Kinaz B
ALP	:	Alkalın Fosfataz
ALT	:	Aminotransferaz
APS	:	Amonyum per sülfat
AST	:	Aspartat Aminotransferaz
ATP	:	Adenozin trifosfat
Bax	:	BCL2 İlişkili X
BCL-2	:	B hücreli lenfoma 2
BCLC	:	Barselona Kliniği Karaciğer Kanseri
cccDNA	:	Kovalent kapalı döngüsel DNA
cDNA	:	Komplementer DNA
CI	:	Confidence interval (Güven aralığı)
CT	:	Bilgisayarlı tomografi
ECM	:	Ekstraselüler matriks
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
ERK	:	Ekstraselüler sinyal regüle kinaz
g	:	Relatif Santrifüj Kuvveti (RCF)
GEO	:	Gene Expression Omnibus
GLOBOCAN	:	Küresel Kanser Gözlem Verisi
HBV	:	Hepatit B Virüsü
HCC	:	Hepatoselüler Karsinom
HCV	:	Hepatit C Virüsü
HepG2	:	Hepatoselüler Karsinom Hücre Hattı
HR	:	Hazard ratio (Tehlike oranı)
HSC	:	Hepatik stellat hücreleri
IL	:	İnterlökin
JAK	:	Janus kinaz
LFT	:	Karaciğer Fonksiyon Testleri
lncRNA	:	Uzun kodlamayan RNA (Long noncoding RNA)
miRNA	:	Mikro RNA
MAP	:	Mitojen aktive protein
MAPK	:	MAP kinaz
MEK	:	Mitojen aktive protein

MMP	:	Matriks metalloproteinaz
mRNA	:	Mesajcı ribonükleik asit
mTOR	:	Rapamisinin Memeli Hedefi
MTT	:	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NAFLD	:	Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı
NASH	:	Alkolsüz steatohepatit / Nonalkolik steatohepatit
NAYKH	:	Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
ncRNA	:	Non-coding RNA
NF-κB	:	Nükleer faktör kappa B
NK	:	Doğal öldürücü hücreler
NLRP	:	NOD-benzeri reseptör proteini (NOD-like receptor protein)
OS	:	Overall survival (Total sağkalım)
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	:	Fosfoinositid-3 Kinaz / Fosfatidilinositol 3-kinaz Yolağı
RAF	:	Hızla düzenlenen fibrosarkom
RNA	:	Ribonükleik Asit
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
rpm	:	Dakikadaki Dönme Sayısı
SD	:	Standart Sapma
STAT	:	Sinyal transduserleri ve transkripsiyon aktivatörleri
TCGA	:	The Cancer Genome Atlas (Kanser Genom Atlası)
TGFβ	:	Transforme edici büyüme faktörü beta
TNFα	:	Tümör nekroz faktör alfa
VEGF	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa Numarası

Şekil 1. Dünyadaki 2020 yılındaki yeni kanser tanısı almış bireylerin yaklaşık sayısı ve dağılımı grafiği. Türkçeleştirilmiştir.(Ferlay J, 2020) .....	6
Şekil 2. Bütün dünyada 2020 yılındaki kanser nedeniyle ölen bireylerin yaklaşık sayısı ve dağılımı grafiği. Türkçeleştirilmiştir.(Ferlay J, 2020).....	7
Şekil 3. 2020 yılındaki Dünya haritasındaki yaş-standartlaştırılmış insidans oranları, her iki cinsiyet ve bütün yaş grupları için. Türkçeleştirilmiştir.(Ferlay J, 2020).....	9
Şekil 4. 2020 yılında Türkiye’deki kanser nedeniyle ölen bireylerin oran ve sayı grafiği, her iki cinsiyet ve bütün yaş grupları için. Türkçeleştirilmiştir.(Ferlay J, 2020).....	10
Şekil 5. HCC başlangıcı için ortak risk faktörleri. Türkçeleştirilmiştir.(Refolo et al., 2020). .	11
Şekil 6. Çeşitli risk faktörleri için şüpheli hepatokarsinogenez mekanizmaları gösterilmiştir.	12
Şekil 7. HCC’nin moleküler patogenezi: adım adım süreç, genomik isabetler ve klonal evrim. Türkçeleştirilmiştir.(Llovet et al., 2022). .....	18
Şekil 8. miR-146 ailesi (Paterson & Kriegel, 2017).....	41
Şekil 9. MiR-146’ nın <i>NFκB</i> sinyal yolağındaki olası görevi(Xiang et al., 2014).....	41
Şekil 10. Kanser fenotiplerinin miR-146-5p modülasyonunun üç basit yolunu gösteren diyagram. ....	42
Şekil 11. Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde tümör büyümesi ve metastasın miR-146b-5p aracılı durdurulmasının şematik gösterimi (C. Li et al., 2017).....	43
Şekil 12. İnsan miR-4510’un gen lokusu .....	45
Şekil 13. lncRNA GAS5’in insan kromozomu üzerindeki ekzon bölgeleri.....	48
Şekil 14. lncRNA GAS5’in glukokortikoid reseptörü ile anahtar kilit modeli (Yu & Hann, 2019) .....	48
Şekil 15. İş akış şeması.....	51
Şekil 16. Amplifikasyon eğrisi, SYBR Green boyasından alınan ışımının sınır değeri aştığı noktaya Ct ya da Cp değerini oluşturur. ....	58
Şekil 17. MiR-146b-5p RT-PCR amplifikasyon eğrisi. ....	58
Şekil 18. LncRNA GAS5 ve LncRNA ACTB için RT-PCR erime eğrisi. ....	60
Şekil 19. 11 numaralı kontrol örneğine ait miR-4510 RT-PCR amplifikasyon eğrisi .....	69
Şekil 20. 13 ve 15 numaralı kontrol örneğine ait miR-4510 RT-PCR amplifikasyon eğrisi ...	69
Şekil 21. mir-146b-5p RT-PCR aplifikasyon eğrisi .....	70

Şekil 22. Serum miR-146b-5p relatif ekspresyon seviyesi.....	71
Şekil 23. lncRNA GAS5 gruplar arasındaki ekspresyon farkı .....	73
Şekil 24. UALCAN veri tabanındaki miR-4510'un ekspresyonu.....	75
Şekil 25. miR-TV veri tabanındaki miR-4510 ekspresyonu grafiği.....	75
Şekil 26. UALCAN veri tabanındaki miR-146b-5p'nin ekspresyonu. ....	76
Şekil 27. miR-TV veri tabanındaki miR-146b-5p ekspresyonu grafiği .....	76
Şekil 28. İki miRNA için ortak hedef genler.....	77
Şekil 29. miR-4510 tarafından hedeflenen genler .....	77
Şekil 30. miR-146b-5p tarafından hedeflenen genler.....	78
Şekil 31. miRNA-gen etkileşim sonucu .....	80
Şekil 32. İki miRNA'nın ve ortak hedef genlerinin ağ temsili. Mavi, farklı miRNA'lar; sarı, ortak hedef genler. ....	80
Şekil 33. TNMPlot ile LIHC ve normal dokularda miR-146b-5p ve miR-4510'un ortak hedef gen analizi. Veriler, TRAF6, TMEM167A ve TMPRSS5 genlerinin araçlarına genel bir bakış sağlar.....	81
Şekil 34. miR-4510 için Ağ Tabanlı Hedef Gen Yolak Zenginleştirilmesi Ve Analizi .....	83
Şekil 35. miR-146b-5p için Ağ Tabanlı Hedef Gen Yolak Zenginleştirilmesi Ve Analizi.....	84
Şekil 36. miR-4510 ve miR-146b-5p için ortak hedef yolak zenginleştirme analizi sonucu...	86
Şekil 37. miR-4510 ekspresyon seviyesinin LIHC hasta sağkalımı üzerindeki etkisi (A). miR-146b-5p ekspresyon seviyesinin LIHC hasta sağkalımı üzerindeki etkisi (B). (p>0.05) .....	87
Şekil 38. UALCAN veri tabanındaki lncRNA GAS5'in ekspresyonu.....	88
Şekil 39. TCGA veri tabanındaki lncRNA GAS5'in ekspresyonu .....	88
Şekil 40. QIAGEN IPA veri tabanındaki lncRNA GAS5 in ilişkili olduğu yollar.....	92
Şekil 41. LncSEA veritabanındaki lncRNA GAS5 için miRNA ve hedef gen network ağı .	92
Şekil 42. GAS5 in HCC'deki sağkalım analiz grafiği.....	93

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa Numarası

Tablo 1. İnsan kodlamayan RNA'larının çeşitleri.....	34
Tablo 2. MiRNeasy Serum/Plazma Kiti içindeki kimyasalların karışma oranları .....	53
Tablo 3. MiRNA'lar için cDNA sentezinin reaksiyon içeriği.....	54
Tablo 4. MiRNA'lar için cDNA sentezinin reaksiyon aşamaları.....	55
Tablo 5. Genomik DNA Eliminasyon mix .....	55
Tablo 6. Reverse-Transkription Mix .....	56
Tablo 7. MiRNA'lar için cDNA sentezinin reaksiyon aşamaları.....	56
Tablo 8. miRNA'lar için RT-PCR reaksiyon içeriği.....	57
Tablo 9. MiRNA'lar için RT-PCR aşamaları.....	57
Tablo 10. LncRNA'lar için bir reaksiyon için PCR bileşenleri .....	59
Tablo 11. LncRNA'lar için RT-PCR aşamaları .....	59
Tablo 12. Çalışmaya dahil edilen bireylerin verileri .....	64
Tablo 13. Örneklerin RNA konsantrasyonlarının ölçüm sonuçları.....	66
Tablo 14. Ekspresyon deneylerinde elde edilen ortalama Ct değerleri .....	67
Tablo 15. miR-146b-5p için $\Delta$ Ct değerleri tablosu .....	70
Tablo 16. miR-146b-5p' nin ekspresyonunun gruplarla istatistiksel ilişkisi.....	71
Tablo 17. miR-146b-5p'nin ikili gruplar şeklinde istatistiksel analizi.....	71
Tablo 18. Cinsiyete göre miR-146b-5p ekspresyonu ile hastalığın ilerleme olasılığı.....	72
Tablo 19. AFP ile mir-146b-5p arasındaki korelasyon .....	72
Tablo 20. lncRNA GAS5 için $\Delta$ Ct değerleri tablosu .....	72
Tablo 21. lncRNA GAS5' in ekspresyonunun gruplarla istatistiksel ilişkisi .....	73
Tablo 22. lncRNA GAS5'in ikili gruplar şeklinde istatistiksel analizi .....	74
Tablo 23. Cinsiyete göre lncRNA-GAS5 ekspresyonu ile hastalığın ilerleme olasılığı .....	74
Tablo 24. AFP ile lncRNA-GAS5 arasındaki korelasyon.....	74
Tablo 25. miR-TV ve UALCAN veri tabanlarındaki miR-4510 ve miR-146b-5p ekspresyonunun farklılıkları.....	75

Tablo 26. hsa-miR-4510 ve hsa-miR-146b-5p için ortak hedef genler.....	79
Tablo 27. miRNA-hedef zenginleştirme analizi sonucu .....	80
Tablo 28. miR-4510 için HCC ile ilgili en önemli 10 KEGG yolu.....	82
Tablo 29. miR-146b-5p için HCC ile ilişkili en önemli 10 KEGG yolu.....	83
Tablo 30. miR-4510 ve miR-146b-5p nin her ikisinde hedef genlerinin ortak yolak analizi listesi.....	84
Tablo 31. lncRNA GAS5 gen ekspresyonun TCGA-LIHC veri setindeki analizi.....	88
Tablo 32. lncRNA GAS5 ile ilişkili hastalık ve fonksiyonlar.....	89
Tablo 34. lncRNA GAS5'in HCC'deki fonksiyon analizi.....	91



## 1. ÖZET

**Tezin başlığı:** Uzun Kodlamayan RNA ve Mikro RNA'ların Hepatoselüler Karsinomunun Erken Tanısında Önemi

**Öğrencinin Adı Soyadı:** Duygu BİRCAN KADIOĞLU

**Danışmanın Adı Soyadı:** Prof. Dr. Fatih EREN

**Programın Adı:** Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora Programı

**Amaç:** MikroRNA (miRNA/miR) ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA), hepatoselüler karsinogenezde önemli bir rol oynar ve HCC için invaziv olmayan bir biyobelirteç olarak hizmet edebilir. Bu çalışma, Hepatit B virüsü (HBV) ile ilişkili HCC (HBV-HCC), HBV ile ilişkili Siroz (HBV-Siroz), Kronik Hepatit B hastaları (KHB) ve sağlıklı deneklerin serumunda miRNA-146b-5p, miRNA-4510 ve lncRNA-GAS5 ekspresyonunu değerlendirmeyi amaçlamıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu kesitsel çalışmada 15 HBV-HCC, 15 HBV-Siroz, 16 KHB ve 16 sağlıklı denekten alınan serum kullanılmıştır. Toplam RNA, serumdan izole edildi ve miRNA ve lncRNA'ların ekspresyonu, qRT-PCR ile ölçüldü ve  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemleri kullanılarak hesaplandı. MiR-TV ve UALCAN veri tabanları kodlamayan RNA (ncRNA)'ların ekspresyonunu analiz etmek için kullanılmıştır. MIENTURNET ve Network Analyst miRNA-hedef etkileşimlerini tahmin etmek ve fonksiyonel zenginleştirme analizini görselleştirmek için kullanılmıştır.

**Bulgular:** MiRNA-4510'in sadece kontrol grubunda bulunan üç bireyde ekspresyonu görülmüştür. MiRNA-146b-5p ekspresyonu en az HBV-HCC grubunda, en çok da kontrol grubunda bulunmuştur. MiR-146b-5p ekspresyonu için HBV-HCC grubu ile HBV-Siroz grubu ve HBV-HCC grubu ile kontrol grubu arasında güçlü bir ilişki saptandı sırasıyla  $p=0,006$  ve  $p=0,005$  olarak bulundu. LncRNA-GAS5 ekspresyonu en az KHB grubunda olmuştur, en çok da kontrol grubunda olmuştur. LncRNA-GAS5 için gruplar ikili şekilde karşılaştırıldığında HBV-HCC grubu ile kontrol grubu arasında ve KHB grubu ve kontrol grubu arasında güçlü bir ilişki saptandı sırasıyla  $p=0,031$  ve  $p=0,002$  olarak bulundu.

**Sonuç:** Sonuç olarak; serum miRNA-146b-5p ve lncRNA-GAS5 seviyelerinin HBV-HCC için non-invaziv tanısal biyobelirteçler olarak hizmet edebilecek potansiyele sahip olduğunu öne sürdük. Birlikte ele alındığında, bulgularımız HBV-HCC tanısı için potansiyel biyobelirteçlere ışık tutmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** miRNA, lncRNA, HCC, Biyobelirteç, Kanser

## 2. SUMMARY

**Title of Thesis:** The importance of long noncoding RNA and microRNAs in the early diagnosis of Hepatocellular Carcinoma

**Student Name, Surname:** Duygu BIRCAN KADIOGLU

**Supervisor Name:** Prof. Dr. Fatih EREN

**Program Name:** Medical Biology and Genetics PhD Program

**Objective:** MicroRNA (miR/miRNA) and long non-coding RNA (lncRNA) play an important role in hepatocellular carcinogenesis and may serve as a non-invasive biomarker for HCC. This study aimed to assess miRNA-4510, miRNA-146b-5p, and lncRNA-GAS5 expression in the serum of patients with hepatitis B virus (HBV)-related HCC (HBV-HCC), HBV-related cirrhosis (HBV-Cirrhosis), chronic hepatitis B (CHB), and healthy subjects.

**Materials and Methods:** This cross-sectional study used serum from 15 HBV-HCC, 15 HBV-Cirrhosis, 16 CHB, and 16 healthy subjects. The total RNA was isolated from serum, and the expression of miRNAs and lncRNAs were measured by qRT-PCR and calculated using  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  methods. The MiR-TV and UALCAN databases aided in analyzing ncRNA expressions, while MIENTURNET and Network Analyst were utilized for predicting miRNA-target interactions and functional enrichment analysis visualization.

**Results:** miRNA-4510 was found exclusively in three control subjects. MiRNA-146b-5p levels were lowest in the HBV-HCC group and highest in controls. Significant correlations were observed between HBV-HCC and HBV-Cirrhosis ( $p=0.006$ ), and HBV-HCC and controls ( $p=0.005$ ). The lncRNA-GAS5 expression was the least in the CHB group and the most in the control group. A strong relationship was found between the HBV-HCC group and the control group, and between the CHB group and the control group, respectively,  $p=0.031$  and  $p=0.002$ .

**Conclusion:** The serum levels of miRNA-146b-5p and lncRNA-GAS5 show promise as non-invasive diagnostic biomarkers for HBV-related HCC. These findings contribute to the identification of potential biomarkers for HBV-HCC diagnosis.

**Keywords:** miRNA, lncRNA, HCC, Biomarker, Cancer

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya çapında her yıl 850.000'den fazla insan hepatosellüler karsinoma (HCC)'dan etkilenmekte ve tedavi hedeflerine ve erken teşhis belirteçlerine ilişkin acil keşifler yapılmasını talep etmektedir. Ne yazık ki, HCC'yi etkileyen moleküler yollar hakkındaki mevcut bilgimiz eksiktir.

Özellikle son yıllarda ncRNA'lar olan miRNA ve lncRNA'ların hücrenin fonksiyonlarının düzenlenmesi üzerine yadsınamaz etkilerinin ortaya çıkarılması; erken tanıda bu epigenetik faktörlerin güçlü bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca HCC'nin alt tiplerine göre miRNA ve lncRNA ekspresyonlarının değişmiş olduğunu gösterilmesi de hastalığın ilerlemeden önce tedavinin uygulanabilmesi açısından çok önemlidir.

Farklı çalışmalar tarafından paylaşılan kısıtlı miRNA panellerinin yanı sıra, bağımsız çalışmalarda dikkate değer bir tutarsızlık gözlemlenmektedir. Bu tutarsızlık, etiyolojilerin, çevresel ve genetik faktörlerin ve teknik ve analitik nedenlerin heterojen yaygınlığına bağlanabilir. HCC alt gruplarını sınıflandıran biyobelirteçlerin eksikliği, hastaları en iyi terapötik seçeneğe tahsis etme becerimizi hala sınırlamaktadır. Bu perspektifte, belirli HCC alt grupları tarafından paylaşılan ortak moleküler özelliklerin belirlenmesi, moleküler olarak tanımlanmış bağlamlarda yeni teşhis ve tedavi yaklaşımlarının keşfedilmesini destekleyerek moleküler bilginin derinleşmesine yardımcı olabilir.

Yapmış olduğumuz kapsamlı literatür taraması sonucunda HCC erken tanısı ile miRNA ve lncRNA arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların kısıtlı sayıda ve ekseriyetle deneysel hayvan ve kültür modellerinde yapıldığını ortaya çıkarmıştır. İnsan çalışmalarında ise hasta sayılarının sınırlı ve heterojen olması dikkat çekmektedir. Ayrıca araştırmaların çoğunda farklı miRNA ve lncRNA'nın HCC'deki farklı sinyal yolları ile ilişkili çıkması diğer ilgi çekici hususdur.

HCC'de hastalığın çeşitli sınıfları ve kontrol bireylerden alınan serum örneklerinde miR-146b-5p, miR-4510 ve lncRNA-GAS5'in HBV ilişkili HCC ile ilişkisinin araştırıldığı retrospektif bir çalışma bilgimize göre literatürde yoktur. Bu çalışmayı planlarken çalışma gruplarında toptancı bir anlayış gözetilerek tüm transkriptlerin taranması yerine literatürde ilişkisi gösterilmiş, yolak üzerindeki olası hedefleri tanımlanmış, fonksiyon testleri ile doğrulanmış çalışmalar referans alınarak mevcut bağlantıyı netleştirecek gelecekte ticarileşme potansiyeli olabilecek ve sağlık uygulamasında ihtiyacı duyulan bir panelin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. MiRNA ve lncRNA'ların serumdaki ekspresyonunun araştırılması tanısall amaçlı basit bir yaklaşımı temsil etse de klinik pratiğe kolay dönüştürülmesi açısından güçlü bir yan sunmaktadır.

Hepatoselüler karsinoma'nın erken evrede saptanması prognoz ve hasta yönetimi açısından çok önemlidir. HCC'yi erken aşamada tespit edecek ideal bir belirteç henüz yoktur. Bu nedenle HCC'li hastalarda erken tanıyı öngörebilecek serumdaki miR-146b-5p, miR-4510 ve lncRNA GAS5'in seviyelerinin HCC hastaları ile HCC'si olmayan kronik HBV enfeksiyonu hastaları veya sağlıklı bireyler arasında farklılık göstereceğini varsaydık. Bu hipotez doğru çıkarsa, HCC yönetiminde büyük bir atılım anlamına gelecek ve bizi bu yaygın hastalık için yeni, hassas ve noninvaziv bir biyobelirteç bulmaya daha da yaklaştıracaktır. Bu amaca uygun olarak Marmara Üniversitesi Gastroenteroloji Enstitüsü Biyobankasında bulunan 18 yaş ve üzeri yetişkin 15 kronik hepatit B (KHB) etyolojili hepatoselüler karsinom tanılı hasta (KHB-HCC), kronik hepatit B etyolojili 15 sirotik hasta (KHB-Siroz), 16 kronik hepatit B'li hasta (KHB) ve 16 kontrol birey çalışmaya dâhil edilmiştir. Her bir bireyden alınan kan örnekleri serum izolasyonları yapılmış ve aligotlanarak -80°C'de dondurularak saklanmıştır. Serum örneklerinden miR-146b-5p, miR-4510 ve lncRNA-GAS5'in ekspresyon düzeyleri kantitatif real-time PCR yöntemiyle (relatif kantifikasyon ile) tayin edilmiştir. Elde edilen veriler ile ekspresyonu değişmiş olan miRNA ve lncRNA'lar tespit edilerek hastalığın erken tanısı açısından değerlendirilmiş ayrıca KHB etyolojili HCC ve HCC giden yolda bulunan diğer gruplar ile olası ilişkiler analiz edilmiştir.

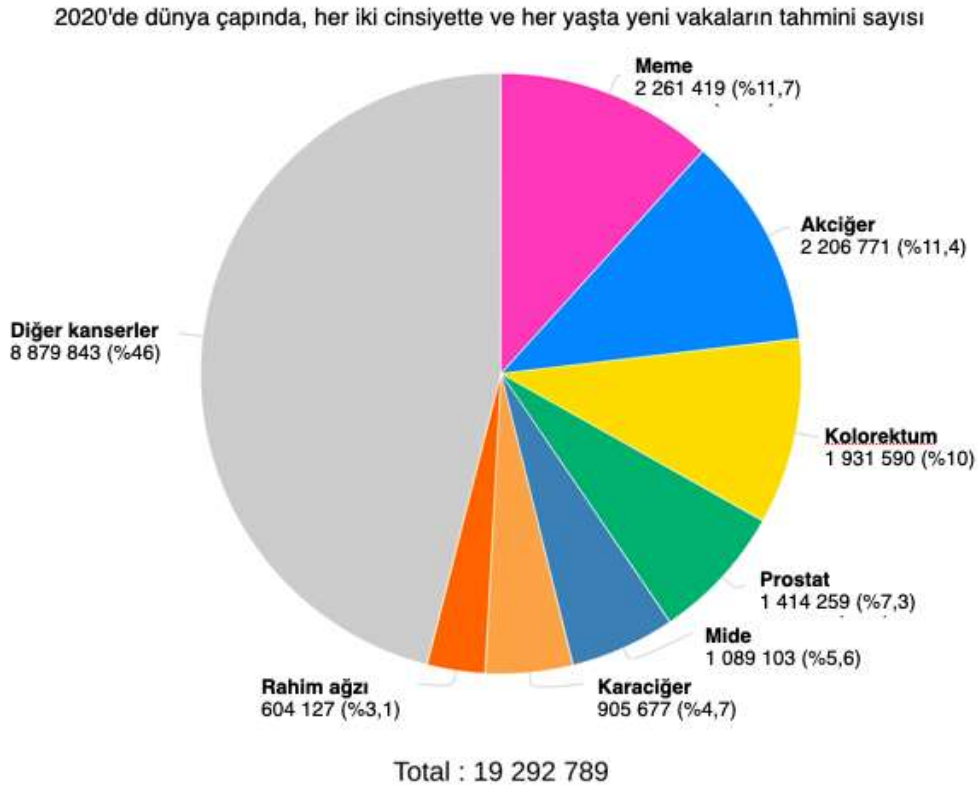
Bu tez çalışmasında, HCC erken tanısında seçmiş olduğumuz miRNA ve lncRNA'lar ile ilişkinin araştırıldığı ve seçilen miRNA ve lncRNA'ların ekspresyon seviyesi ile hastalığın alt grupları arasındaki ilişkiyi değerlendiren ilk çalışmadır. Bu yeni çalışmada, HBV ile ilişkili HCC (HBV-HCC), HBV ile ilişkili siroz (HBV-Cirrhosis), Kronik Hepatit B (CHB) hastaları ve sağlıklı bireylerin serumlarında miRNA-146b-5p, miRNA-4510 ve lncRNA-GAS5 ekspresyonunu değerlendirmeyi ve bu ncRNA'ların hastalarının serumunda ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında tespit edilebilir olup olmadığını, değişip değişmediğini belirlemeyi amaçladık. Ayrıca biyoinformatik kısımdaki amacımız, ncRNA'ların hedef genlerini ve HBV-HCC'deki ekspresyonunu daha iyi anlamak için miR146b-5p, miR-4510 ve lncRNA-GAS5'in ekspresyon verilerini ve biyoinformatik analizleri birleştirerek kanser yolaklarıyla ilişkisini ortaya çıkarmak ve bu ncRNA'ların hedef genlerinin HBV-HCC'nin klinik evresi ile ilişkisini belirlemektir. Hepatoselüler kanser patogenezini daha iyi anlamaya çalışmak tanı ve tedavide bize yol gösterici olacaktır. Hepatokarsinogenez yolağındaki moleküler yolakların daha iyi anlaşılması hastalığın tanısı, tedavisi ve hatta önlenmesinde öncü olabilir. Bu sayede literatürdeki eksiklik giderilmiş olup, seçilmiş ncRNA'lar erken tanıyı predikte ederek tedavi rejimlerinin hızlı bir şekilde optimize edilmesine, gereksiz cerrahi ve radyolojik operasyonların önüne geçilmesine olanak sağlayabilir. Bu çalışma ve devamında

yapılacak benzer çalışmalar kaynaklı biyomarker panelin ihtiyaç göz önüne alındığında ticarileşme potansiyelinin yüksek olabileceği ve girişimcilik başvurularına da destek olabileceği düşüncesindeyiz. NcRNA'ların hedef gen ve protein-protein etkileşim (PPI) ağları oluşturduk. Tanımlanan merkez genler ve bunların etkileşimleri, HCC gelişimi ve proliferasyonunda altta yatan faktörleri açıklığa kavuşturabilir. Bu çalışma, HBV etyolojili HCC'nin potansiyel hastalık ilerlemesini keşfetmeye yardımcı olabilir ve HCC'nin belirlenmesi ve prognozu için HBV ile ilişkili miRNA/hedef genler hakkında bilgi sağlayabilir.

## 4. GENEL BİLGİLER

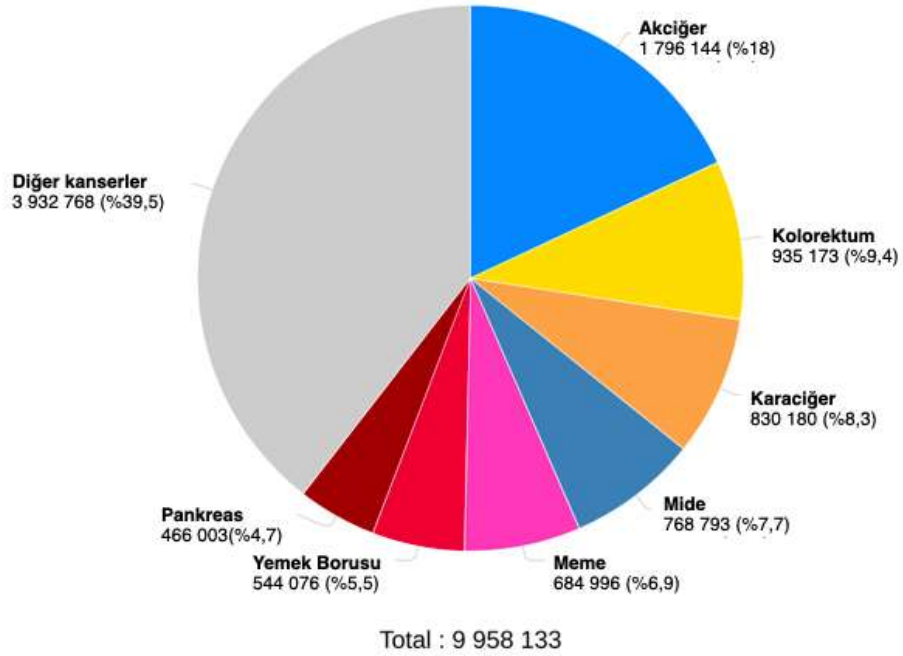
### 4.1. Karaciğer Kanseri

Karaciğer kanseri en zorlu kanserler arasında yer alıyor ve 2025 yılına kadar 1 milyondan fazla insana teşhis konması bekleniyor. 2020 yılı Küresel Kanser Gözlem Verisi (GLOBOCAN) verilerine göre Dünya’da toplam karaciğer kanserlerin görülme sıklığı 905.677 olgusu ile (%4,7) altıncı sıradayken, kansere bağlı ölümlerde 830.180 vakayla (%8,3) üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 1-2). Çoğu bölgede hem insidans hem de mortalite oranları erkekler arasında kadınlara göre 2 ila 3 kat daha yüksektir ve karaciğer kanseri küresel insidans açısından beşinci, erkekler için mortalite açısından ikinci sırada yer almaktadır. Hastalık, Doğu Asya’daki coğrafi olarak farklı 11 ülkede (Diğer ülkeleri çok aşan oranlara sahip; Moğolistan), Güneydoğu Asya (örneğin, Tayland, Kamboçya ve Vietnam) ve Kuzey ve Batı Afrika (örneğin, Mısır ve Nijer) en yaygın kanserdir. Primer karaciğer kanseri, hepatoselüler karsinomu (HCC) (vakaların %75-85’ini oluşturur) ve intrahepatik kolanjiokarsinomu (%10-%15) ve diğer nadir türleri içerir (Ferlay J, 2020; Sung et al., 2021). (Son Erişim Tarihi 24 Ekim 2023)



Şekil 1. Dünyadaki 2020 yılındaki yeni kanser tanısı almış bireylerin yaklaşık sayısı ve dağılımı grafiği. Türkçeleştirilmiştir. (Ferlay J, 2020)

2020'de dünya çapında, her iki cinsiyette ve her yaşta ölümlerin tahmini sayısı



**Şekil 2.** Bütün dünyada 2020 yılındaki kanser nedeniyle ölen bireylerin yaklaşık sayısı ve dağılımı grafiği. Türkçeleştirilmiştir.(Ferlay J, 2020)

#### 4.2. Hepatosellüler Karsinoma

Hepatosellüler karsinom (HCC) karaciğerin primer tümörüdür ve karaciğerin primer tümörlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. HCC kanserler içinde dünyada beşinci sırada (Asafo-Agyei & Samant, 2023) ve maligniteye bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır (McGlynn et al., 2021; Sung et al., 2021). Erkeklerde akciğer kanserinden sonra kanserden ölümlerin ikinci önde gelen nedeni HCC'dir (Ferlay J, 2020). HCC'nin beş yıllık sağkalım oranı %18'dir ve pankreas kanserinden sonra ikinci sıradadır (Jemal et al., 2017). Hepatosellüler karsinom için önemli risk faktörleri arasında viral hepatit (hepatit B ve hepatit C), alkolik karaciğer hastalığı ve alkolik olmayan karaciğer steatohepatiti/alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı yer almaktadır. HCC, siroz tanısı konan hastaların yaklaşık %85'inde görülür (Ioannou et al., 2007).

Kronik hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu dünya çapında HCC'nin önde gelen nedenidir. Evrensel hepatit B aşılmasının dünya çapında HCC insidansını azaltması muhtemeldir. HCC gelişimi için yüksek risk taşıyan sirotik olmayan kronik hepatit B virüsü enfeksiyonu, yüksek aminotransferaz (ALT) ve yüksek serum hepatit B virüsü DNA'sı olan hastalar, ailede HCC öyküsü, Sahra altı Afrika'dan 20 yaşından büyük hastalar, 40 ve 50 yaşından büyük Asyalı erkekler ve kadınlar gözetim altında tutulmalıdır (Galle et al., 2018). HCC tanısı, alfa-

fetoprotein gibi serum biyobelirteçlerinin yükselmesi, ultrason, kontrastlı bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi görüntüleme yöntemleri ve biyopsi ile konur. Her 4-6 ayda bir ultrason ve alfa-fetoprotein (AFP) ile veya AFP olmadan yapılan gözetimin erken HCC tespitini artırması muhtemeldir.

HCC'nin yönetimi karmaşıktır ve HCC için farklı uzmanlık alanlarından çeşitli tedaviler vardır. Tıbbi onkoloji, cerrahi, radyasyon onkolojisi, girişimsel radyolojiyi içeren ve hepatolog tarafından yönetilen meslekler arası bir ekip, hepatoselüler karsinomlu hastalara bütünsel ve entegre bir yaklaşım sağlamak ve mümkün olan en iyi sonuçları elde etmek için önemlidir (Asafo-Agyei & Samant, 2023).

#### **4.2.1. Hepatoselüler karsinom epidemiyolojisi**

Hepatoselüler karsinom (HCC), dünya genelinde en sık görülen kanserler arasında yer alır ve en yaygın beşinci solid kanser türüdür. Aynı zamanda kansere bağlı ölümlerin üçüncü en yaygın nedenidir ve 2018 yılında 780.000 ölüm HCC'den kaynaklanmıştır. Yakın zamanda açıklanan kanser verileri, yaklaşık 840.000 yeni HCC vakasının teşhis edildiğini gösterdi ve tahminler, 2040 yılında HCC vakalarında %61'lik bir artış olacağını gösteriyor (Ferlay J, 2020; Fleischhacker & Schmidt, 2007). Erkekler, kadınlara kıyasla karaciğer kanserine yakalanma açısından daha yüksek risk altındadır. HCC insidansı, erkeklerde kadınlara kıyasla üç kat daha yaygındır. Cinsiyete göre değerlendirmede, yetişkin erkekler %59,6'sını oluşturmakta ve kansere bağlı ölümlerde ikinci sıradadır, kadınlar ise %29,4'ünü oluşturmakta ve kansere bağlı ölümlerde sekizinci sırada olduğu belirtilmektedir (Chidambaranathan-Reghupaty et al., 2021).

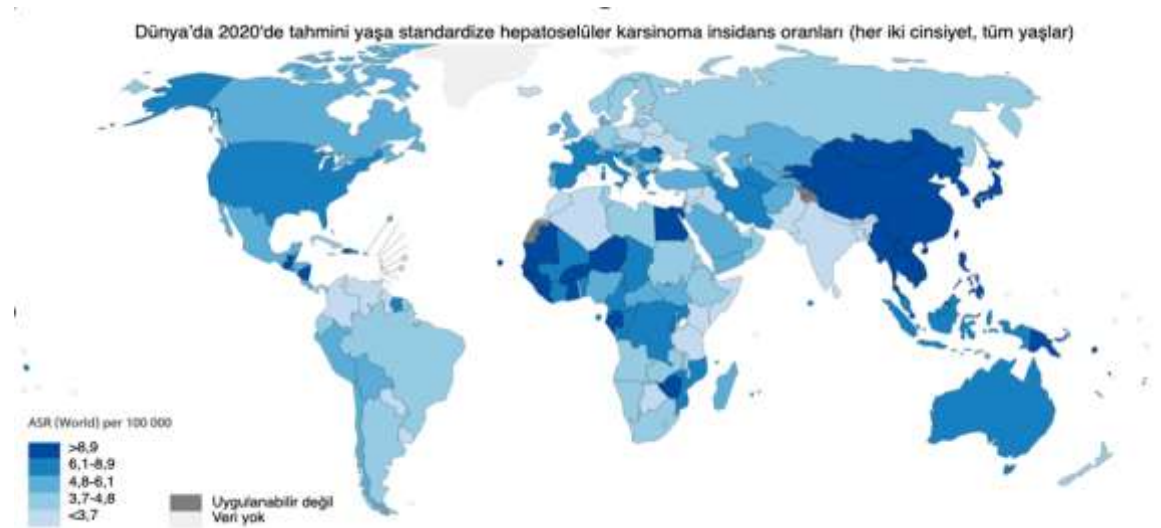
Yeni HCC vakalarının %80'inden fazlası Doğu Asya ve Sahra altı Afrika'da meydana gelmektedir (Ferlay J, 2020; Yang et al., 2019). Yüksek riskli HCC bölgelerinin çoğunda (Çin, Kore Cumhuriyeti ve Sahra Altı Afrika), temel belirleyiciler kronik HBV enfeksiyonu, aflatoksine maruz kalma veya her ikisidir; diğer ülkelerde (Japonya, İtalya ve Mısır) Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu muhtemelen başlıca nedendir (McGlynn et al., 2021; Sung et al., 2021).

Bu olguların %72,5'i ve küresel HCC'ye bağlı ölümlerin %73,3'ü Asya ülkelerinde bulunmaktadır (Ferlay J, 2020). Ancak, Asya içindeki belirli coğrafi bölgelerde büyük farklılıklar rapor edilmektedir. Moğolistan'da HBV ve HCV ile HBV taşıyıcılarının HCV veya hepatit delta virüsleriyle ko-enfeksiyonlarının yanı sıra alkol tüketimi de yüksek yüke katkıda bulunmaktadır (Chimed et al., 2017). GLOBOCAN 2020'ye göre, Moğolistan hem insidans hem de ölüm oranı (85,6 ve 80,6/100 000) açısından yaşa standardize edilmiş en yüksek orana

sahiptir. Görülme sıklığı ve ölüm oranları, birçok yüksek riskli ülkede 1970'lerin sonlarından bu yana azalmıştır (Petrick et al., 2020). Bu eğilimler muhtemelen HBV ve HCV'nin popülasyon seroprevalansındaki azalmanın yanı sıra aflatoksin maruziyetindeki azalmayı da yansıtmaktadır. Büyük bir halk sağlığı başarısı olan HBV'ye karşı aşılama, ilk kez 1980'lerin başında uygulamaya konulduğu Doğu Asya'daki yüksek riskli ülkelerde HBV enfeksiyonu prevalansını ve HCC görülme sıklığını önemli ölçüde azaltmıştır (Chang et al., 1997)

Birçok bölgede HBV ve HCV prevalansının azalması ve aşırı vücut ağırlığı ile diyabetin artmasıyla birlikte başlıca risk faktörlerinin geçiş halinde olduğu görülmektedir (Marengo et al., 2016). Ayrıca, son yıllarda önceden düşük riskli ülkelerde (Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya/Yeni Zelanda ve Güney Amerika'daki çoğu ülke) görülme oranları artmış veya daha yüksek bir seviyede sabitlenmiştir; bunun nedeni muhtemelen kısmen aşırı vücut ağırlığı ve diyabet hastalığının yaygınlığının değişmesidir. (Florio et al., 2020; Petrick et al., 2020).

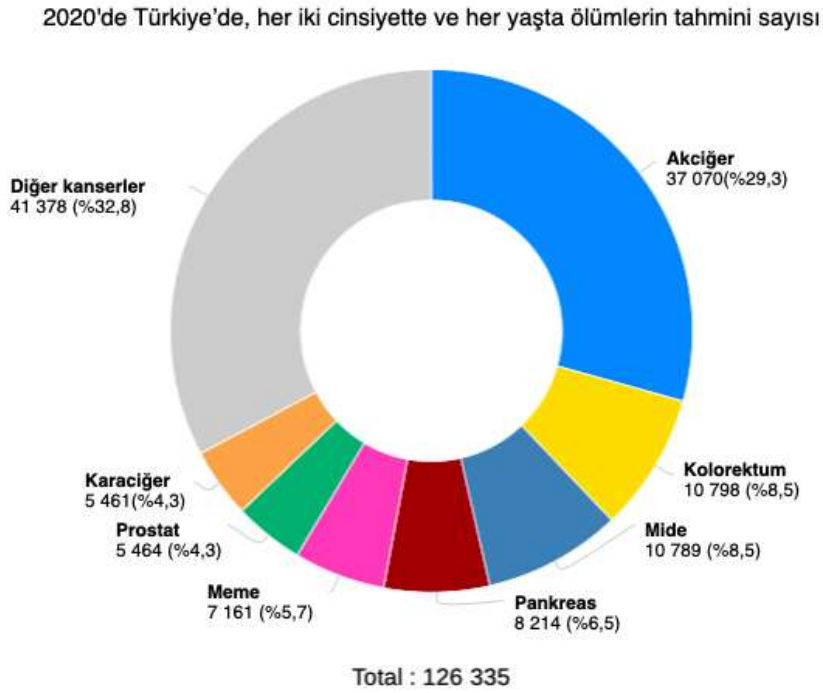
Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde HCC birkaç yıldır en sık teşhis edilen kanserler arasındadır ve kansere bağlı ölümlerin en hızlı yükselen nedenleri arasındadır (Siegel et al., 2021). HCC'nin başlangıç yaşı dünyanın farklı yerlerinde değişiklik gösterir, ABD'de medyan yaşı 64'tür. 2016-2030 yılları arasında obezite ve diyabetteki artışa bağlı olarak ABD'de HCC insidansının %122 oranında artması beklenmektedir (Ioannou et al., 2019)(Şekil 3).



**Şekil 3.** 2020 yılındaki Dünya haritasındaki yaş-standartlaştırılmış insidans oranları, her iki cinsiyet ve bütün yaş grupları için. Türkçeleştirilmiştir.(Ferlay J, 2020)

HCC görülme sıklığındaki artış kadar hastalığın etiyojisi de farklı etnik kökenlerde farklılık göstermektedir. HCC gelişiminden HBV enfeksiyonları sorumlu gibi görünürken, Hispanik etnik kökene sahip kişilerde çoğunlukla Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı (NAFLD)

nedeniyle HCC gelişmiştir (White et al., 2017). HCC insidansı ve etiyolojisi de aynı ülkede farklılık gösterebilir. Örneğin Türkiye’de yapılan bir çalışma, HCC etiyolojisinin aynı coğrafi bölgede bulunan şehirlerden bile farklı olduğunu göstermiştir (Akkiz et al., 2018). GLOBOCAN verilerine göre ülkemizde HCC kanser sebepli ölümlerde yedinci sırada yer almaktadır (Şekil 4). Aşılamanın yaygınlaşmasıyla azalan oranları çeşitli sebeplerden dolayı 2040 yılında %50’den fazla artması beklenmektedir (Ferlay J, 2020). Etnik gruplar arası çeşitliliğin nedeni çeşitli genetik değişikliklerden veya ortalama yaş ve/veya cinsiyet dağılımı gibi nüfus dinamiklerinden kaynaklanabilir. Bu nedenle etnik gruplar arası farklılıkların önemli risk faktörlerine maruz kalma süresiyle ilişkili olma olasılığı daha yüksektir.

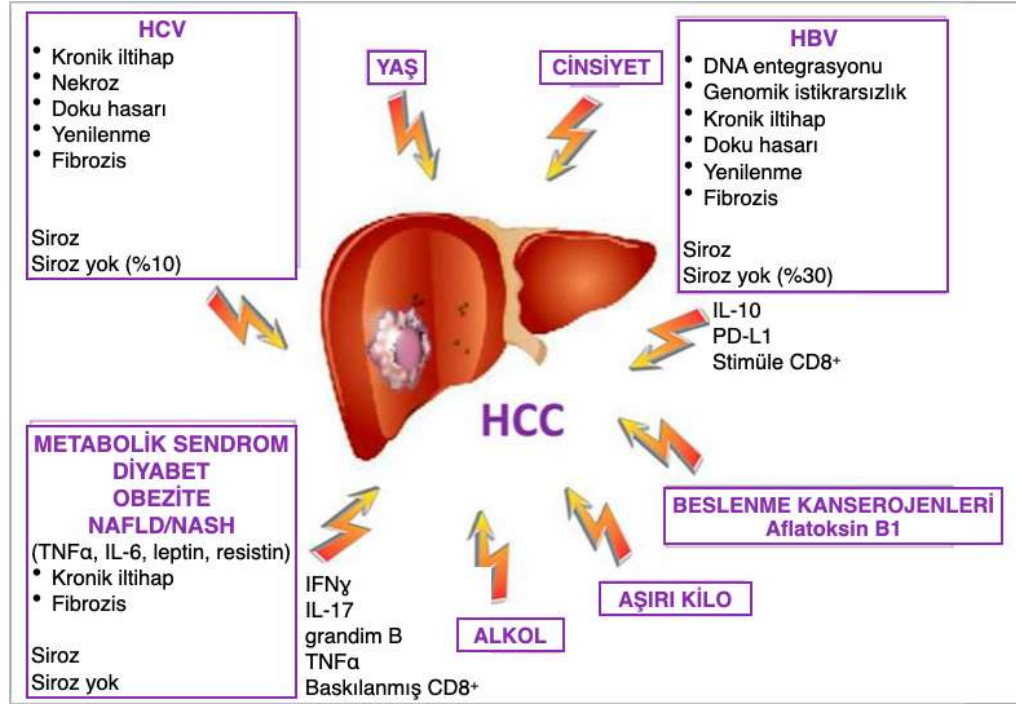


**Şekil 4.** 2020 yılında Türkiye’deki kanser nedeniyle ölen bireylerin oran ve sayı grafiği, her iki cinsiyet ve bütün yaş grupları için. Türkçeleştirilmiştir.(Ferlay J, 2020)

#### 4.2.2. Hepatoselüler karsinoma risk faktörleri

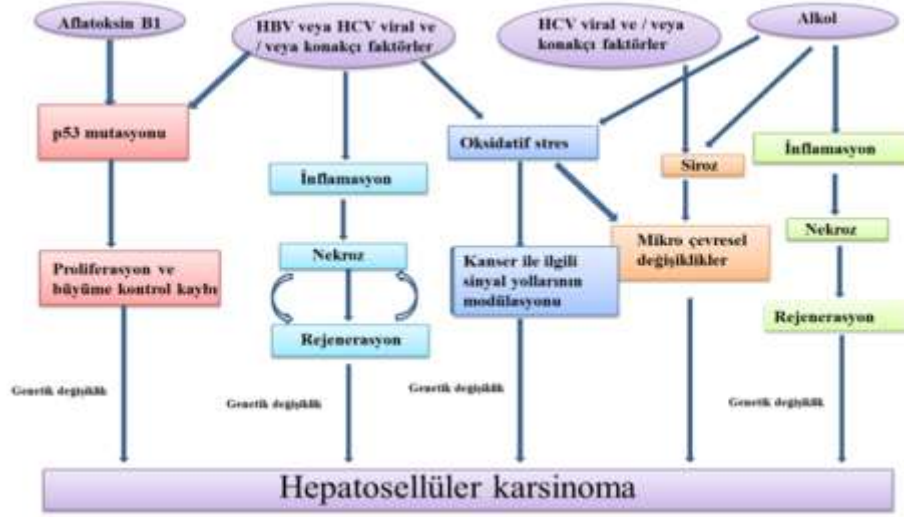
HCC, birçok risk faktörü tarafından uzun süre maruziyetiyle oluşan karaciğerin karmaşık ve heterojen bir malignitesidir (Balogh & Victor, 2016). Hepatit B virüsü (HBV) ve Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonları, alkole bağlı yağlı karaciğer hastalığı (AFLD), alkolik olmayan karaciğer steatohepatiti (NASH), alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), aşırı alkol tüketilmesi, aristoloşik asit ve aflatoksinli gıdaların aşırı tüketilmesi, diyabet ve sigara hepatoselüler karsinom gelişimi için etiyolojik faktörlerdir (Asafo-Agyei & Samant, 2023). Şekil 5, HCC başlangıcında rol oynayan risk faktörlerini göstermektedir (Refolo et al., 2020). Viral ve viral olmayan etiyolojiye sahip faktörler, bazı durumlarda HCC gelişimi için gerekli bir koşul olmayan siroza dönüşebilen fibrozis oluşumuna yatkınlık sağlayan inflamatuvar bir

mikroçevrenin oluşumuna yol açan spesifik araçları serbest bırakarak HCC'nin başlangıcından sorumlu olabilir (Refolo et al., 2020). Burada sayılan her bir faktör aynı zamanda siroza yol açtığından, siroz HCC için başlıca risk faktörleri arasındadır (Yang et al., 2019). Tedavi seçeneklerinin yetersiz kalması nedeniyle HCC'nin gelişiminde rol oynayabilecek kontrol edilebilir risk faktörlerinin belirlenmesi ve bunlardan kaçınılması dünya çapında HCC insidansını kontrol altına alınmasına ve azaltılmasına katkı sağlayacaktır (Yang et al., 2019).



**Şekil 5.** HCC başlangıcı için ortak risk faktörleri. Türkçeleştirilmiştir.(Refolo et al., 2020).

HCC gelişimine yol açan biyolojik ve kimyasal karsinojenik faktörlerin birbirinden farklı moleküler karsinogenez süreçlerine yol açabileceği olasıdır. Şekil 6'de çeşitli risk faktörleri için şüpheli hepatokarsinogenez mekanizmaları gösterilmiştir. Ortak noktalar aynı renk kullanılarak belirtilmiştir. Bu mekanizmalara ek olarak, HBV ve aflatoxin B1 genomu etkileme özelliğini paylaşmaktadır. HBV konak genomuna entegre olabilir ve aflatoxin B1 bir mutajendir. Bu sebeple, daha spesifik biyobelirteçler ve hedeflenebilir genler ile gen ürünlerinin keşfinde, çalışmaya alınan hasta grubunun hastalığın etiyolojisi açısından homojen olması büyük önem taşımaktadır. Aşağıda hepatosellüler kanser etiyolojisinde rol aldığı bilinen faktörler belirtilmiştir.



**Şekil 6.** Çeşitli risk faktörleri için şüpheli hepatokarsinogenez mekanizmaları gösterilmiştir.

### **Viral hepatitler**

Kronik HBV ve HCV enfeksiyonu, HCC vakalarının %70'inden fazlasıyla ilişkilidir (Asaf-Agyei & Samant, 2023; Mohammed et al., 2007). Viral olmayan risk faktörlerinin karaciğer kanseri yükü üzerindeki etkisi giderek daha önemli hale gelse de, HBV enfeksiyonu ve HCV enfeksiyonu karaciğer kanserinin dünya çapındaki ölümlerin sırasıyla %56'sını ve %20'sini oluşturduğundan, viral hepatitin ortadan kaldırılması küresel olarak HCC'nin önlenmesinde birincil temel strateji olmaya devam etmektedir (Plummer et al., 2016). Coğrafi olarak HCV nedeniyle gelişen HCC'ler ABD'de yaygınken, HBV kaynaklı HCC Asya ülkelerinde daha yüksek oranda görülmektedir (Hoshida et al., 2010; Kulik & El-Serag, 2019; Trépo et al., 2014)

### **Hepatit B virüsü**

Hepatit B virüsü (HBV) Hepadnavirüs ailesine ait zarflı bir virüstür. HBV DNA'sı, ipliklerin 5' uçları arasında yapışkan, kısa bir örtüşme bölgesinin yer aldığı, yaklaşık 3200 baz çiftine sahip kısmen çift sarmal, halkasal bir genoma sahiptir. HBV'nin transkripsiyonel şablonu, hepatosit çekirdeği içinde kapalı, oldukça küçük kovalent dairesel bir kromozom olarak bulunan cccDNA'dır. CccDNA'nın korunması, virüsün kalıcılığı için esastır. (Locarnini & Zoulim, 2010). DNA'nın replikasyonu, revers transkripsiyon ile bir pregenom RNA'nın 5' kopyasına bağlanmasıyla başlar. Ters transkriptaz hataya meyillidir ve mutasyon oranı yüksektir. Bundan hareketle 1980'lerde, rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle beraber, revers transkriptaz inhibitörleri geliştirilmiş ve HBV enfeksiyon tedavisinde etkili yollar aranmıştır (Seeger & Mason, 2015).

Dört okuma çerçevesinden oluşan (core, yüzey, x ve polimeraz bölgesi) virüs DNA'sı yedi protein yapıyı sentezler. Bunlar "core" protein, "precore" protein, pol ve hepatit B viral protein (HBx) ile 1960'ların sonunda serumda keşfedilen küçükten büyüğe sırasıyla S, M, L olarak adlandırılan üç HBV zarf proteinden (Hepatit B yüzey antijenleri- (HBsAg)) ibarettir (Seeger & Mason, 2015). Virüs nükleik asit ve yapısal protomer biriminin oluşturduğu, nükleokapsitin alt birimi olan "core" ve "pol", konakçı hücre sitoplazmasında yer alan viral DNA'nın sentezi için gerekli revers transkriptaz, RNaz H gibi enzimleri ve primeri kodlar. Viral RNA'ların sentezinde, cccDNA'nın tam ve etkin transkripsiyon için yapısal HBx protein gereklidir (Seeger & Mason, 2015). Çalışmalar, viral proteinlerin konakçı genomunu etkileyebileceği, gen ekspresyonunu değiştirebilecek şekilde konakçı proteinlerle etkileşime girdikleri gösterilmiştir (Hussain et al., 2007). Bu noktada HBx'in hepatositte ekspresyon düzeyine bağlı olarak hücre ölümü veya HCC gelişiminde rol oynayan transaktivatör görevi gördüğü, bir proto-onkogen olan c-Myc ile etkileşimini güçlendirdiği, sitoplazmada tümör protein 53 (P53) proteini ayırarak hepatosit patogenezi ve HCC'yi indüklediği ifade edilmektedir (Schuster et al., 2000; Terradillos et al., 1998).

HBV'nin hepatositlere girişi için reseptör sodyum taurokolat polipeptididir (Yan et al., 2012). Hepatit B virüsü genomunun konak genomuna entegrasyonu, HBV'de onkogenezi için birincil patogenezdır. Viral genomun insan genomunun telomeraz ters transkriptaz (TERT) promotör bölgelerine eklenmesi, HCC vakalarının %60'ını oluşturan mutasyonla sonuçlanır (Schulze et al., 2016). Diğer genetik değişiklikler arasında TP53 (hücre döngüsünü etkileyen), beta-1 katenin (CTNBI), eksen inhibitörü-1 (AXINI), AT-zengin etkileşim alanı içeren protein 1A (ARID1A) ve ARID2 (kromatin proliferasyonu) mutasyonları yer alır.

En yaygın HBV mutasyonları arasında precore bölgesinde 1896 pozisyonunda stop kodonu oluşturan tek nükleotid değişikliği ve bazal core promoter bölgesinde 1762 ve 1764 pozisyonlarında precore mesajcı RNA (mRNA)'nın transkripsiyonunu azaltan çift nükleotid değişikliği yer almaktadır (Okamoto et al., 1994). Bu mutasyonlar virüsün replikasyon kapasitesini etkilemeden HBeAg üretimini ortadan kaldırmakta veya azaltmakta ve HBeAg-negatif kronik HBV enfeksiyonuna neden olmaktadır. Precore ve bazal core promoter mutasyonları tek başına veya birlikte ortaya çıkabilir.

Bu HBeAg-negatif mutantların coğrafi yaygınlığı, ilişkili HBV genotiplerinin yaygınlığı ile ilişkilidir. Virüs, A-J olarak etiketlenen en az on genotipte sınıflandırılabilir (Lin & Kao, 2011). A genotipi Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ve Afrika'da sık görülürken, B ve C genotipleri Asya'da yaygındır ve D genotipi çoğunlukla Akdeniz ülkeleri, Orta Doğu ve Hindistan'da tespit

edilmiştir. HBV genotipleri hastalığın ilerlemesini ve interferona yanıtı etkileyebilir (Kim et al., 2011).

Dünya nüfusunun %30'unda görülebilen Hepatit B ve dünya çapında kronik hepatitin en yaygın nedenidir. İlk olarak 1990'larda da HBV ile HCC arasındaki ilişki açık bir şekilde ortaya konmuştur (Seeger & Mason, 2015). Hepatit B virüslerin neden olduğu enfeksiyonlar birkaç ay gibi kısa süreli ve geçici olabildiği gibi, bireyin yaşamı süresince devam eden, siroz, karaciğer yetmezliği ve HCC ile sonuçlanabilen kronik enfeksiyon tablosu da görülebilmektedir (Seeger & Mason, 2015; Xie, 2017). Hepatit B hastalarında hepatoselüler karsinom insidansı viral yük, enfeksiyon süresi ve karaciğer hastalığının ciddiyeti ile artmaktadır (Forner et al., 2018). Gizli hepatit B virüs enfeksiyonu da virüs entegrasyonunun neden olduğu DNA hasarı nedeniyle artmış risk ile ilişkilidir (Forner et al., 2018). Kronik HBV enfeksiyonundan sonra, sirozlu vakaların yaklaşık %20-30'unda HCC gelişir (Song et al., 2016). HBV ile ilişkili HCC'nin %80'inden fazlasında altta yatan siroz vardır (Thiele et al., 2014).

Ayrıca HCC, hepatit B virüsü enfeksiyonu ile enfekte hastalarda siroz yokluğunda ortaya çıkabilir. Bunun yanında, HBV ile enfekte olup sirozu olmayan ve HCC gelişen bir grup vaka da vardır (Velázquez et al., 2003). Her iki durumda da daha büyük bir tümör yükü kötü bir prognozla ilişkilidir. Bu nedenle erken teşhis, tümörlerin küratif bir aşamada tanımlanmasına yardımcı olarak başarılı tedavi ve uzun süreli sağkalım şansını artırır (El-Serag et al., 2008; Song et al., 2016). Ancak bu hala çok zorlu bir süreçtir ve non-invaziv tanı araçlarının geliştirilmesi büyük bir zorluk teşkil etmektedir (Cao et al., 2018; Zhao et al., 2015). HBV'li hastalarda hepatoselüler karsinom için güçlü bir risk belirleyicisi yüksek serum HBV DNA seviyeleridir (10.000 kopya/mL'ye eşit veya daha fazla) (Chen et al., 2006). Bu durum hastanın hepatit B e antijen (HBeAg) durumundan bağımsızdır (Yang et al., 2002). Ayrıca, HBeAg'nin pozitifliği artmış HCC insidansı ile ilişkilidir. Bu, uzamış replikasyon fazının bir göstergesi olabilir. HBV genotip C, HCC için artmış risk ile ilişkilidir (Yu et al., 2005). Hepatit B virüs yükü düşük ancak HBsAg seviyeleri 1000 IU/mL'den yüksek olan hastalar, HCC ile önemli ölçüde ilişkilidir (Tseng et al., 2012).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre Türkiye, hepatit B için orta düzeyde (%2-8) endemisiteye sahiptir (Gurol et al., 2006). Türkiye'de hepatit epidemiyolojisi üzerine yapılan geçmiş çalışmalar, genel kronik HBV enfeksiyonu prevalansının %4-10 (batı bölgelerinde %3,5 ve doğu bölgelerinde %7) ve hepatit B virüsünün yüzey antijenlerine karşı vücut tarafından üretilen antikör (anti-HBs) pozitifliğinin %20,6-52,3 olduğunu göstermiştir (Altay et al., 2012; Mistik,

2007; Tosun, 2013). Ayrıca viral hepatit B ve C enfeksiyonları, alkol kullanımı ve metabolik bozukluklar karaciğer sirozu ve HCC gelişimi için çoklu risk faktörleridir. Son yıllarda büyük terapötik ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, genel sağkalım oranı hala çok düşüktür ve HCC hastaları için prognoz geç tanı, kemoterapi başarısızlığı ve sık nüks nedeniyle kötü olmaya devam etmektedir. HCC'nin erken teşhisi hastalar için en iyi hayatta kalma şansını sunmaktadır, ancak bu hala çok zordur ve non-invaziv tanı araçlarının geliştirilmesi büyük bir zorluk teşkil etmektedir (Cao et al., 2018; Zhao et al., 2015).

2022 yılı sonu itibarıyla 190 ülke, HBV aşısını ulusal bebek aşılama programlarına dahil etmiş ve 3 doz hepatit B aşısının küresel kapsamının yaklaşık %84 olduğu tahmin edilmektedir ((WHO), 2020) (Son Erişim Tarihi 26 Ekim 2023).

### Hepatit C virüsü

Hepatit C virüsü (HCV), 11 ana genotipi ve 15 farklı alt tipi olan, kısmen çift sarmallı, pozitif anlamlı bir RNA virüsüdür. HCV genomu, konak genomu ile entegra olamaz. HCV genotip 1b daha sık HCC ile ilişkili bulunmuştur (Bruno et al., 2007; Swenson et al., 1991). Dünya çapında teşhis edilen HCC vakalarının %20'sine HCV neden olduğu bulunmuştur (Ikeda et al., 2007). HCV ile ilişkili HCC çoğunlukla siroz veya ileri fibrozis evreleri olan hastalarda görülmüştür (Lok et al., 2009). Sirozu olmayan hastalarda daha az sayıda HCV ile ilişkili HCC vakası belgelenmiştir (Nash et al., 2010). Kronik hepatit C virüsü enfeksiyonunda kronik inflamasyon ve bunu izleyen fibroz, nekroz ve rejenerasyon HCC gelişimine katkıda bulunur. Karaciğer karsinogenezinde kaydedilen moleküler belirteçler viral yapısal ve yapısal olmayan proteinleri (NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B) içerir (Asafo-Agyei & Samant, 2023). Hepatit B virüsü ile viral koenfeksiyon ve hepatit delta virüsü ile viral koenfeksiyon HCC için artmış risk ile ilişkili bulunmuştur (Fattovich et al., 2000; Ikeda et al., 2007).

### **Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)**

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), alkol öyküsü olmaksızın hepatositlerde aşırı yağ bulunmasıdır. NAFLD, özellikle batı ülkelerinde olmak üzere dünya çapında HCC'nin önde gelen nedenlerinden biridir (Yasui et al., 2011). NAFLD çoğunlukla metabolik sendrom ortamında ortaya çıkar. Metabolik sendrom, kardiyovasküler riski artıran insülin direnci, hipertansiyon, hipertrigliseridemi ve abdominal obezite olan hastalarda ortaya çıkar (Asafo-Agyei & Samant, 2023). Arka planda siroz olmaksızın HCC'ye sahip olduğu belirtilen hastaların %13'ünde NAFLD olduğu kaydedilmiştir (Mittal et al., 2016).

## **Alkol**

Amerika Birleşik Devletleri'nde HCC'nin %30'u aşırı alkol alımı öyküsüyle ilişkilidir. Alkol doğrudan ve dolaylı olarak HCC'ye neden olabilir. Alkol siroz yoluyla dolaylı olarak HCC'ye neden olabilir. Alkol reaktif oksidatif stres (ROS) ve inflamasyonun artmasına yol açar. Günde 80 g'dan fazla alkol almak HCC riskini beş kat artırır (Asafo-Agyei & Samant, 2023).

## **Aflatoksinler**

Aflatoksin B1, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen bir mikotoksindir. Bu mantar çoğunlukla Sahra Altı Afrika ve Güneydoğu Asya'da tahıllara bulaşmaktadır. Karsinogenez çoğunlukla tümör baskılayıcı genin (p53) mutasyonu yoluyla gerçekleşir. Aflatoksin B1, kronik hepatit B virüsü olan hastalarda HCC için artmış risk ile ilişkilidir (Asafo-Agyei & Samant, 2023).

Diğer risk faktörleri arasında aşırı demir yüklenmesi, Glikojen depo hastalığı, Wilson hastalığı, alfa bir antitripsin hastalığı, hiperkitrullinemi, Alagille sendromu ve akut aralıklı porfiriler yer almaktadır.

### **4.2.3. Hepatoselüler karsinoma patogenezi**

Hepatoselüler karsinom, hepatositlerin malign bir tümürüdür. Sitolojik özellikler hepatositlerin farklılaşmasına bağlıdır. İyi farklılaşmış HCC'den kötü farklılaşmış HCC'ye kadar. Trabeküler mimari patern en yaygın olanıdır. Diğer paternler arasında psödoasiner (proteinli materyal içeren asiner), kompakt ve sarkomatoid bulunur.

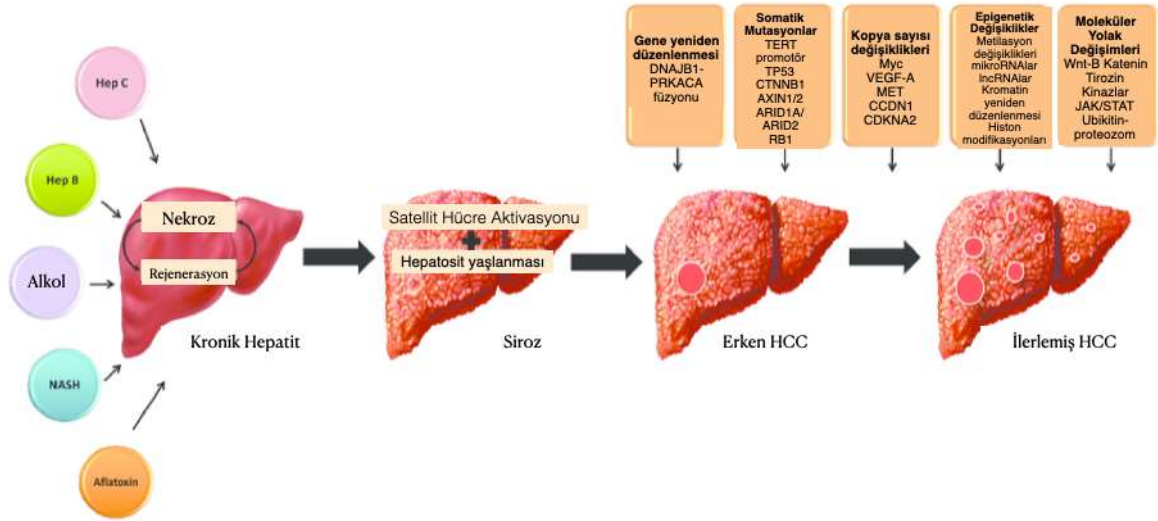
Bu neoplazmlar, displastik nodüllerin ortaya çıkmasıyla başlayan ve nihayetinde HCC'ye dönüşebilen iyi tanımlanmış histopatolojik evreler dizisi boyunca ilerler (Zucman-Rossi et al., 2015). Hem genetik hem de epigenetik mekanizmaların (TERT promoter mutasyonları, kromozomal aberasyonlar ve metilasyon olayları) displastik nodüllerin malign dönüşümü için bekçi olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Hepatokarsinogenez, TERT, TP53 ve CTNNB1'deki mutasyonlar gibi bir tümör başlatma olayı gerektirir ki bunlar küçük HCC tümörlerinin %51'inde zaten mevcuttur. Daha sonra edinilen genetik değişiklikler ve tümör mikroçevresindeki değişiklikler, bu tümörlerin evrimsel seçilimin sürekli baskısı altında ileri evrelere ilerlemesini sağlayarak geniş intratümöral heterojeniteye yol açmaktadır (Şekil 7). Genetik ve epigenetik onkojenik değişiklikler muhtemelen, farklılaşmış özelliklerine rağmen fakültatif bir kök hücre olan bir hücre tipi olan hepatositler içinde meydana gelir (Llovet et al., 2021). Olgun hepatositler HCC için ana köken hücreler olsa da karaciğer kök hücreleri ve

transit çoğalan hücre popülasyonları da karaciğer onkogenezi dahil edilmiştir (Sia et al., 2017). Preklinik modellerde, hepatik onkogenezi, hepatositlerin telafi edici rejenerasyonu ile hücre ölümü tarafından desteklenir ve apoptozun bloke edilmesi HCC oluşumunu azaltır (Hirsova et al., 2020). Yenilenen hepatositler içindeki replikatif stres, özellikle inflamasyon ve fibrozis bağlamında transformasyon ve kanser ilerlemesini destekleyen genetik lezyonları indükler (Bayard et al., 2018). İnsan NASH’inde, oto-agresif CD8+ PD1+ T hücreleri hepatosit hücre ölümünü indükler, NASH patogenezi destekler ve immün gözetimi bozar, böylece HCC oluşumunu ve ilerlemesini destekler (Pfister et al., 2021)

Öte yandan, somatik genomik ve epigenetik değişikliklerin ardışık birikiminin karaciğer karsinogenezi önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. *PNPLA3* rs738409, *TM6SF2* rs585542926 ve *HSD17B13* rs72613567 (metabolizmada yer alan proteinleri kodlayan) dahil olmak üzere karaciğer hastalığına yatkınlık yaratan tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) HCC riskini artırmaktadır (Gellert-Kristensen et al., 2020). Aflatoksin B1 ve aristoloşik asit, HCC’de somatik mutasyonlara neden olan çevresel genotoksik bileşiklerdir (Yang et al., 2019). Mısır ve fındıkta bulunan bir aspergillus metaboliti olan Aflatoksin B1, HBV enfeksiyonu olan hastalarda HCC’yi sinerjik olarak teşvik eder. Çin bitki çaylarında bulunan aristoloşik asit, bol miktarda T’den A’ya onkojenik transversiyona neden olur (Nault & Letouzé, 2019). HCC tümörlerinde ortalama 60-70 somatik mutasyon bulunur. Çoğunluğu karsinogenetik sürece doğrudan katılmazlar, ancak bazı mutasyonlar "sürücü genler" olarak adlandırılan genlerde meydana gelir ve karaciğer karsinogenezi için anahtar olan sinyal yollarını aktive eder. Viral genomun insan genomunun telomeraz ters transkriptaz (TERT) promotör bölgelerine eklenmesi, HCC vakalarının %60’ını oluşturan mutasyonla sonuçlanır (Schulze et al., 2016). Ayrıca, TERT promotörüne HBV veya adeno-ilişkili virüs 2 (AAV2) entegrasyonu da bildirilmiştir (Ningarhari et al., 2021).

TERT-aktive edici mutasyonlar displastik nodüllerin %20’sinde görülür ve bu moleküler özelliği HCC’nin varsayılan bir bekçisi haline getirir (Torrecilla et al., 2017). Yüksek düzeyde telomeraz eksprese eden hepatosit alt popülasyonları tüm karaciğer bölgelerine dağılmış olarak bulunur (Lin et al., 2018) ve bunlar hücre yaşlanmayı önleyerek hepatokarsinogeneze katkıda bulunabilir, böylece kronik karaciğer hasarında mutasyona eğilimli bir çoğalan hücre kaynağı sağlar. Displastik nodüllerde bulunan diğer epigenetik (örn. *TSPYL5*’in hipermetilasyonu) ve genetik değişikliklerin (örn. chr. 8q kaybı) kanser bekçileri olduğu öne sürülmüştür (Hernandez-Meza et al., 2021; Torrecilla et al., 2017) HCC’de en sık değiştirilen ikinci gen,  $\beta$ -katenin kodlayan ve Wnt yolunun kritik bir efektörü olan *CTNNB1* (~%30) genidir. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyali büyük ölçüde hepatik lobülün üçüncü bölgesi ile sınırlıdır ve  $\beta$ -

katenin mutasyonlarını içeren hepatokarsinogenez muhtemelen bu hepatik bölgede meydana gelir (Llovet et al., 2022; Sun et al., 2021). Diğer önemli mutasyonlar *TP53* (~%25) ve *AXIN1* (~%10) veya *BAP1*, *ARID1A/B* ve *ARID2* gibi epigenetik düzenleyicilerde meydana gelmektedir. *PDGFR*, *MET*, *EGFR*, *PIK3CA* gibi (tirozin kinaz inhibitör) TKI'ler için geleneksel hedeflerdeki mutasyonlar nadirdir (<%3) (Llovet et al., 2022).



**Şekil 7.** HCC'nin moleküler patogenezi: adım adım süreç, genomik isabetler ve klonal evrim. Türkçeleştirilmiştir.(Llovet et al., 2022).

## Siroz

Siroz, hepatoselüler karsinom için viral karsinogenezde önemli bir adımdır. HCC'nin neredeyse %70-90'ı siroz zemininde gelişmiştir ve dünyanın geri kalanıyla karşılaştırıldığında Batı ülkelerinde senaryo daha dramatiktir. HCC sirozun herhangi bir aşamasında gelişmiştir. Hepatit B virüsü genomunun konak genomuna entegrasyonu, HBV'de onkogenез için birincil patogenezdır. Kronik inflamasyon ve bunu takip eden karaciğer hasarı, kalıcı karaciğer hasarına neden olur ve sonunda siroz gelişir ("EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma," 2012). Yaralanma üzerine ilk bakışta karaciğer fibrozu ortaya çıkar ve bu, yaralı dokuda klasik bir iyileşme tepkisi olarak kabul edilir. Eş zamanlı olarak siroz, karaciğer fibrozunun son aşaması olarak sınıflandırılmış ve bunu karaciğer parankimi bozukluğu ve kan akışında bozulma takip etmiştir. Buna paralel olarak portal hipertansiyon ve asit birikimi gibi çeşitli ikincil komplikasyonlar ortaya çıkabilir ve karaciğer fonksiyon kaybını daha da tetikleyebildiği gösterilmiştir (D'Amico et al., 2006).

Günümüze kadar karaciğer hastalıklarını tedavi etmek ve yönetmek için muazzam terapötik gelişmelere rağmen siroz hala karaciğer kaynaklı sağlık yükünün önemli bir bölümünü temsil

etmektedir (Blachier et al., 2013). Karaciğer sirozu ve sekonder komplikasyonları da HCC hastalarının prognozunu ve hatta tedavi yöntemlerini etkilemektedir ("EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma," 2012). Örneğin, sirozun düzeyine göre, HCC tedavisi için rezeksiyon ve transarteriyel kemoembolizasyon (TACE) dahil olmak üzere standart yaklaşımlar, beklenmedik komplikasyonlara ve kanserli olmayan karaciğerin hasar görmesine neden olabilir ve bu da sağlıklı karaciğer fonksiyonunu daha da etkileyebilir (Russell, 2015)

Kronik HBV ve HCV enfeksiyonu olan hastalarda sirotik karaciğerdeki displastik nodüllerin erken dönemde iyi diferansiye HCC olarak karşımıza çıktığı ve devam eden çok aşamalı bir süreçle farklılaştığı ve dediferansiye HCC olarak geliştiği ortaya konmuştur. Bugün ise HCC'nin moleküler mekanizmaları görece aydınlatılmış olmakla beraber, tümör baskılayıcı genlerin etkin olduğu çoklu savunma mekanizması ve karsinogenezdeki kimi noktalar belirsizliğini hala koruyor (Link & Iwakuma, 2017). HCC'nin, büyük oranda spesifik risk faktörleri arasında sayılan HBV veya HCV enfeksiyonu, yoğun alkol kullanımı, alfatoksin maruziyeti, alfa-1-antitripsin eksikliği veya son dönemde oranı artmakta olan alkolsüz steatohepatit risk faktörlerinin de yer aldığı sirozlu veya sirozsuz kronik karaciğer zemininde geliştiği artık net olarak bilinmektedir. HCC'lerin gelişiminde yine bu mekanizmaların da içinde yer aldığı hepatik adenomlar öncü lezyon olarak kabul edilse de vakaların oranını belirlemek oldukça zordur (Sempoux et al., 2014). HCC'nin öne çıkan bir başka özelliği de multifokal HCC gelişimidir. Bu durum intrahepatik metastaz olarak yorumlanan tek bir odaktan köken alan, eş zamanlı olarak birçok odağın ortaya çıkması veya intrahepatik metastaza kıyasla daha yüksek oranla, birbirinden bağımsız birden fazla odağın oluşumuyla görülür. Bu iki mekanizma HCC patogenezindeki farklılıkların daha kolay görülmesini sağlamakta önemli fırsatlar sunabilmektedir (Feo & Pascale, 2015; Schlageter et al., 2014; Utsunomiya, 2005).

#### **4.2.4. Hepatoselüler karsinoma tanısı**

Birçok kanserde olduğu gibi, erken teşhis ile sağ kalım önemli ölçüde arttırılır. Medyan sağ kalımı erken HCC'li hastalarda 60 aydan fazladır, ancak ileri aşamada tespit edildiğinde 15 aydan daha azdır. Risk altındaki hastaların gözetimi sonuçları iyileştirir, ancak HCC için risk altında olanların %20' sinden daha azı süreyans alır ve mevcut süreyans stratejileri sınırlı duyarlılığa ve özgünlüğe sahiptir.

Hepatoselüler karsinoma tanısında kullanılan başlıca diagnostik teknikler serum belirteçlerini, karaciğer fonksiyon testlerini, çeşitli görüntüleme yöntemlerini ve histolojik incelemeyi

kapsamaktadır. HCC'nin erken tespiti için yeterli duyarlılık veya spesifikliğıe sahip kan bazlı biyobelirteçlerin olması gereklidir, ancak şu ana en yaygın olarak kullanılan biyobelirteç olan AFP, HCC erken tanısı için yetersiz performans özelliklerine sahiptir. Biyobelirteç validasyon aşamalarından geçen ve HCC'nin erken tespiti için umut vaat eden birkaç aday serum proteomik, glikomik ve genetik belirteç vardır, ancak bu belirteçler iyi hazırlanmış kohortlarda doğrulama gerektirir. Devam eden prospektif veya retrospektif kohort çalışmaları, biyobelirteçlerin validasyonunu sağlayacaktır.

### **Biyokimyasal tanı**

Alfa-1 fetoprotein (AFP) gebelikte fetal karaciğer hücreleri tarafından üretilen ve normal şartlarda erişkinlerde baskılanan bir glikoproteindir ve serum belirteçleri arasında sıklıkla kullanılır. Patolojik olarak, kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda yüksek hepatosit rejenerasyonuna bağlı AFP miktarında artış olabilmekte ve bu nedenle kansere özgü ayırıcı tanıda kullanılamamaktadır. AFP yerine son yıllarda, AFP'nin temel glikoformu olan ve malign hücreler tarafından üretilen lens culinaris agglutinin-reaktif alfa-1 fetoprotein (AFP-L3) miktarı dikkate alınarak, total AFP miktarının %10'undan fazla ise pozitif kabul edilmektedir. Serum AFP'nin duyarlılığı yaklaşık %66 ve özgüllüğü 10,9 ng/ml (normal değer 10 ila 20 ng/mL arasındadır) ile %80'dir (Marrero et al., 2009). 200 ng/ml'den fazla belirgin şekilde yükselmiş AFP düzeyleri HCC'yi saptamak için oldukça özgüldür ancak orta düzeyde duyarlılığı sahiptir (Chan et al., 2014). 500 ng/mL'lik bir kesme noktası kullanarak karaciğer hastalığı olan hastalarda HCC'yi tespit etmek %90'dan fazla özgüllüğü sahiptir (Johnson, 2001). Serum alfa-fetoprotein seviyeleri kronik hepatit, siroz, gebelik ve diğer germ ve germ dışı tümörleri olan hastalarda yükselebilir (Sterling et al., 2012). Alfa-fetoprotein gözetim için ultrason ile birlikte kullanılır. Ayrıca, HCC hücrelerinde kazanılmış post-translasyonel defekt sonucu oluşan anormal protrombin prekürsörü, des gamma karboksi protrombin (DCP) değerleri de AFP ve AFP-L3 sonuçları ile birlikte değerlendirilmektedir. Normal olarak sadece plasenta ve fetal karaciğerde bulunan glipikan-3 (GPC3) ekspresyonu da HCC belirteci olarak kullanılabilir. Bu belirteçler dışında  $\alpha$ -L-Fukosidaz, skuamöz hücreli karsinom antijeni (SCCA), Golgi proteini 73 (GP73), hepatosit büyüme faktörü (HGF), TGF- $\beta$ 1, VEGF de diagnostik amaçlı kullanılmaktadır. Ancak bu belirteçler, diğer kanser türlerinde de saptandığından HCC'ye özgü değildir. Son zamanlarda yüzey geliştirilmiş lazer desorpsiyonu / iyonizasyonu uçuş zamanlı kütle pektrometrisi (SELDI-TOF) ile yapılan serum proteomiks çalışmalarında, küçük tümörlerin saptanabilmesi amacıyla, tanıda kullanılmak üzere daha yüksek ayırt edici özellikteki hassas proteinlerin belirlenmesi için araştırmalar devam etmektedir.

Yüksek alfa-fetoprotein seviyelerine sahip HCC, kötü diferansiye HCC ile ilişkilidir ve kötü prognoz sağlar (Matsumoto et al., 1982). Hepatit B virüsü ile ilişkili HCC ve pozitif serum hepatit B e antijeni (HBeAg) olan hastalar, kötü prognoz ve daha yüksek HCC nüksü ile ilişkilidir (Kubo et al., 2002; Sun et al., 2007). Yüksek serum hepatit B virüsü DNA seviyeleri HCC ve nüks için daha yüksek risk ile ilişkilidir (Kim et al., 2008; Wu et al., 2009) Diabetes mellitus HCC gelişimi için bir risk faktörüdür ve aynı zamanda kötü prognoz ile ilişkilidir (Wang et al., 2014).

HCC prezentasyonu tümörün evresine ve arka plandaki siroza bağlıdır. Sirozla ilişkili olmayan HCC, hastalığın erken evresinde asemptomatik olarak ortaya çıkabilir. Sirotik ilişkili HCC hastaları, kötüleşen sarılık, kaşıntı, hepatik ensefalopati, asit, üst karın bölgesinde ele gelen kitle, ateş, halsizlik, kilo kaybı, erken doyma, abdominal distansiyon ve kaşeksi gibi dekompanse karaciğer yetmezliği semptomlarıyla başvurabilir. Karın ağrısı HCC için en sık görülen semptomdur. HCC hastalarında paraneoplastik sendrom hipoglisemi, eritrositoz, hiperkalsemi, diyare ve pemfigus foliaceus, pityriasis rotunda, dermatomiyozit ve Leser-Trelat belirtisi gibi kutanöz bulgularla ortaya çıkabilir. Semptomatik hastalar varis kanaması, intraperitoneal kanama, tıkanma sarılığı, piyojenik karaciğer apsesi ve hepatik ensefalopati ile başvurabilir. HCC'nin en yaygın ekstrahepatik metastazı sırasıyla akciğer, intra-abdominal lenf nodu, kemik ve adrenaldir (Harding et al., 2018).

Hepatoselüler karsinomalı hastaların prognozu tümör boyutuna, histopatolojide tümörün farklılaşmasına veya derecesine, altta yatan karaciğer hastalığının ciddiyetine, metastazların varlığına veya yokluğuna ve tümörün komşu yapılara yayılmasına bağlıdır. Tümör-nod-metastaz (TNM) performans durumu ve karaciğer fonksiyon bozukluğu derecesini hesaba katmaz. En yaygın evreleme sistemi Barselona kliniği karaciğer kanseridir (BCLC). Diğer evreleme sistemleri arasında Çin Üniversitesi Prognostik İndeksi, Japonya Entegre Evreleme, İtalyan Karaciğer Kanseri Programı yer almaktadır.

## **Evreleme**

BCLC, hastaların performans durumu, karaciğer yükü ve karaciğer fonksiyonu dahil olmak üzere en fazla prognostik bilgiyi sunmaktadır (Bruix & Sherman, 2011; Marrero et al., 2005). Sistem, HCC'li hastaları beş aşamadan birinde sınıflandırmaktadır. Evreye bağlı olarak tedavi önerileri sağlayan 0, A, B, C ve D alt tabakaları. Tümör yükü nodüllerin boyutu ve sayısı, ekstrahepatik yayılım veya makrovasküler tümör invazyonunun varlığı ya da yokluğuna göre değerlendirilir. Karaciğer fonksiyon testi Child-Turcotte-Pugh skoru, Son Dönem Karaciğer Hastalığı Modeli ve albümin-bilirubin derecesi ile değerlendirilir.

Hepatoselüler karsinomun hepatik komplikasyonları arasında hepatik ensefalopati, portal ven trombozu, kötüleşen asit, varis kanaması, tıkanma sarılığı ve piyojenik karaciğer apsesi yer alır. İntraperitoneal kanama, HCC'nin hayatı tehdit eden bir komplikasyonudur. Hastalar kötüleşen karın çevresi ve ağrısı, hipotansiyon ve anemi ile başvurur. Embolizasyon ile acil anjiyografi ve kanamanın kontrolü için cerrahi. Tanı için kontrastsız BT batın taraması ve acil anjiyografi çalışmaları için anjiyografi ile BT batın taraması gereklidir. HCC'nin en yaygın ekstrahepatik metastazı sırasıyla akciğer, intra-abdominal lenf nodu, kemik ve adrenaldir (Harding et al., 2018). Beyin tümörü HCC'nin nadir bir ekstrahepatik belirtisidir.

HCC etiyojisini değerlendirmek için yapılan diğer laboratuvar incelemeleri arasında hepatit B yüzey antijeni, anti-HCV antikoru, alfa antitripsin seviyesi, bakır seviyeleri ve demir satürasyonu bulunmaktadır (Asafo-Agyei & Samant, 2023).

### **Görüntüleme**

HCC ultrason, bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile teşhis edilebilir.

Ultrason (US), HCC ve sürveyans için yaygın olarak kullanılan, invazif olmayan bir tarama testidir. Duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %51-%87 ve %80-%100 arasında değişmektedir (Hanna et al., 2016). Kontrastsız US, HCC'nin boyutunu, morfolojisini, yerini ve vasküler invazyonunu belirler. HCC, yağ infiltrasyonu veya fibrozis zeminine bağlı olarak hipoekoik veya hiperekoik olabilir. HCC artmış kan akımı ve neovaskülarite gösterir. USG, 2 cm'den küçük tümörlerin tespiti için sınırlıdır (D'Onofrio et al., 2008). Kontrastsız ultrasonda tespit edilen lezyonların karakterizasyonu için kontrastlı ultrason (CEUS) kullanılır. CEUS, daha önce kontrastsız US'de HCC olarak gösterilen lezyonları teşhis etmede %97'den fazla özgüllüğe ve %90 oranında duyarlılık ve hassasiyete sahiptir (Claudon et al., 2013).

Yüksek riskli hastalarda HCC gözetimi için altı ayda bir serum alfa-fetoprotein içeren veya içermeyen ultrasonografi önerilmektedir.

Trifazik bilgisayarlı tomografi (BT) taraması ile HCC'yi tespit etmek için tanısal görüntüleme kriterleri arasında arteriyel fazda hiper-artış ve portal venöz faz sırasında karaciğer arka planına göre hızlı yıkanma yer alır. Kontrast BT'nin lezyon başına duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %65 ve %96'dır. Duyarlılık 2 cm'den küçük lezyonlar için %40'a düşer. Pozitif prediktif değer 2 cm'den büyük veya eşit lezyonlar için %92'nin üzerine çıkar (Elsayes et al., 2017; Yu et al., 2011).

MRG; T1 ağırlıklı görüntüler fibrozis, yağ ve nekroz derecesine bağlı olarak izointens ile hiperintens olabilir. T1'deki hiperintens görüntüler çoğunlukla iyi diferansiye tümörlerdir ve T2 görüntülerinde izointens olarak görünürler. Kötü veya orta derecede farklılaşmış tümörler T1 görüntülerde izointens ve T2 görüntülerde hiperintens olarak görülür. Kontrastlı MRG'nin duyarlılığı %77-%90 ve özgüllüğü %84-97'dir (Asafo-Agyei & Samant, 2023).

Amerikan Radyoloji Derneği (ARA) hepatik nodülleri sınıflandırmak için bir karaciğer görüntüleme raporlama ve veri sistemi (LI-RADS) geliştirmiştir ve 2018 yılında Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği (AASLD) de dahil olmak üzere birçok dernek tarafından benimsenmiştir. Lezyon, portal venöz veya gecikmiş fazda periferik olmayan bir yıkama görünümü, arka plandaki karaciğer parankimine göre rim arteriyel faz dışı hiperenhancement, pürüzsüz güçlendirici kapsül görünümü ve 6 aydan kısa sürede boyutta %50'den fazla artış göstermelidir. Yüksek riskli hastalar arasında kronik hepatit B virüsü enfeksiyonu, siroz, eşzamanlı veya önceden HCC tanısı olan hastalar ve HCC için bir gözetim US'sinde tanımlanan lezyon bulunur (Asafo-Agyei & Samant, 2023; Tang et al., 2018).

### **Karaciğer biyopsisi**

Karaciğer biyopsisi HCC için rutin olarak yapılmaz, çünkü prosedür tümör kanaması ve kanama riski ve uygun bölgeden doku elde edilememesi durumunda yanlış negatiflik ile ilişkilidir. Karaciğer biyopsisinin tümörün boyutuna bağlı olarak %66-%93 arasında bir duyarlılığı, pozitif prediktif değeri ve %100 özgüllüğü vardır (Jain, 2014).

AASLD, kontrastlı görüntülemelerde HCC için tipik olmayan ve LI-RADS-M veya LI-RADS-4 olarak kategorize edilen lezyonlarda biyopsi yapılmasını önermektedir. Yüksek dereceli displastik nodüllerden HCC tanısının doğruluğunu artıran çeşitli biyobelirteçler arasında ısı şok proteini 70 (HSP70), glikan-3 (GPC3) ve glutamin sentetaz (GS) bulunmaktadır (Chen et al., 2014; Tremosini et al., 2012).

### **4.2.5. Hepatoselüler karsinoma tedavisi**

HCC'nin tedavisi genellikle karmaşıktır, çünkü siroz HCC'li kişilerin %80'iyle ilişkili majör klinik risk faktörüdür ve postoperatif karaciğer yetmezliğini indüklemeye riski nedeniyle cerrahi rezeksiyon potansiyeli sınırlıdır. Son yirmi yıla girildiğinde HCC'nin moleküler mekanizmaları ve patofizyolojik arka planı hala tam olarak aydınlatılamamıştır (De Minicis et al., 2013). Bu nedenle HCC gelişimi ile ilgili moleküler ve biyokimyasal yolları ve bunların birbiri ile olan ilişkisini anlamak son derece önem arz etmektedir.

HCC semptomlarındaki sınırlı bilgi olması ve tekdüzelik olmaması nedeniyle, geçmişte sınırlı başarı ile birçok farklı tedavi stratejisi geliştirilmiştir. HCC tedavisi için en yaygın kullanılan klinik tedavi, karaciğer nakli ve karaciğerin rezeksiyonudur. Bununla birlikte, bu tedavilerin kendi sınırlamaları ve kanserin nüksetme riski vardır. Bu nedenle, radyofrekans ablasyonu ve kemoterapi dahil olmak üzere başka klinik tedaviler de geliştirildi, ancak sınırlı bir başarı elde edildi (Hann, 2008; Witczak-Malinowska et al., 2003). Şu anda, uygun tedavi seçenekleri yoktur çünkü bu tedavilerin hedef genlerinin çoğu hücre işlevi için kritik olan farklı yolların bir parçasıdır. Bu nedenle, HCC ile ilgili bildiklerimizde ve moleküler süreçlerde birçok bilgi boşluğu olduğu söylenebilir.

Hepatosellüler kanser hastalarında erken tanı alan hastalara tümör rezeksiyonu ve karaciğer nakli tedavileri seçenek olarak sunmaktadır. Ancak, hastaların yaklaşık yüzde 85'i hastalığın ileri evrelerinde ilk tanı aldıkları için bu tedavi seçeneklerinden faydalanamamaktadırlar (Crissien & Frenette, 2014). HCC hastalarında hala genel sağkalım oranı oldukça düşüktür. ABD'de 11.187 vakanın incelendiği bir çalışmada HCC hastalarında genel sağkalım oranının 6-20 ay olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmanın sonuçlarında, hastalarda 2 yıllık genel sağkalımın %50'nin altında ve 5 yıllık genel sağkalımın ise sadece %10 olduğu belirtilmektedir (Golabi et al., 2017). Bu yöntemlerin dışında HCC tedavisinde perkutanöz etanol enjeksiyonu, radyorekans ablasyon, trans-arterial kemoembolizasyon, radyoembolizasyon ve kemoterapi kullanılabilir (Raza & Sood, 2014).

Son yıllarda gerçekleştirilen, Çin'de 2887 hasta ile yapılan bir araştırmada, HCC hastalarında ortalama genel sağkalım süresinin yaklaşık olarak 9 ay olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, katılımcıların %49,3'ünün 1 yıl, %35,3'ünün 2 yıl, %26,6'sının 3 yıl ve %19,5'inin ise 5 yıl genel sağkalım gösterdiği de bildirilmiştir (Wang & Li, 2019). Bu sonuçlar popülasyonda genel tarama yapmaya imkân sağlayacak yeni, spesifik ve etkili diagnostik biyobelirteçlerin, hastalığın izleminde ve tedavisinde kullanılacak prognostik biyobelirteçler ile terapötik moleküler hedeflerin keşfedilmesine olan acil ihtiyacı vurgulamaktadır.

HCC'nin epidemiyolojisine ve moleküler profiline yönelik çalışmalar gelişim mekanizmalarını sistematik olarak ortaya konmuştur. Ancak bu mekanizmaların aydınlatılmasıyla beklenen, kişiye yönelik tedavi protokollerin oluşturma çalışmaları henüz arzu edilen seviyelere ulaşamamıştır (Llovet et al., 2016). HCC tedavi protokolleri, tümör özellikleri, karaciğer fonksiyon bozuklukları ve yaş gibi birçok farklı parametre gözetilerek belirlenmektedir. Erken evre HCC'ler local ablasyon, cerrahi rezeksiyon veya karaciğer transplantasyonu ile küratif olarak tedavi edilebilirken bazı vakalarda kateter bazlı lokal tedavi bir seçenek olabilmektedir.

Bununla birlikte özellikle ileri evre HCC hastalar için kinaz ve immün kontrol noktası inhibitörleri, bugüne kadar pek de başarılı olmayan HCC'nin medikal tedavilerinde, etkili bir seçenek olarak gün geçtikçe daha çok önem kazanmakta, dikkatleri üzerine çekmektedir (Yang et al., 2019).

### **Cerrahi rezeksiyon**

Barselona klinik karaciğer kanseri (BCLC) sınıflandırması çok erken (0) ve erken evre (A) olan hastalar cerrahi rezeksiyon için ideal adaylardır. Çok erken (0) evrede karaciğer fonksiyonu korunmuş, Avrupa kooperatif onkolojik grup performans durumu (ECOG-PS) skoru 0 ve 2 cm'lik soliter nodül vardır. Karaciğer fonksiyonu korunmuş ve ECOG-PS skoru 0 olan ve 2 cm'den büyük soliter nodülü olan erken evre (A) hastalar için uygun cerrahi rezeksiyon adaylarıdır (Roayaie et al., 2015).

Child-Turcotte-Pugh A olan ve klinik olarak anlamlı portal hipertansiyonu olmayan hastalar olumlu cerrahi rezeksiyon sonuçlarına sahiptir. Küçük HCC (5 cm'den küçük tümörler) ve Child-Pugh A olan hastalarda 5 ve 10 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %70 ve %35, nüksüz sağkalım oranları ise %36 ve %22'dir (Poon et al., 2002). Cerrahi rezeksiyondan sonra HCC nüksünün öngörücüleri arasında mikro ve makrovasküler invazyon, tümör farklılaşması ve uydu nodüllerin varlığı yer almaktadır. Beş yıllık nüks riski %70'e kadar çıkmaktadır (Tabrizian et al., 2015). Adjuvan tedavilerin nüks riskini azalttığı gösterilmemiştir (Bruix et al., 2015).

### **Tümör ablasyonu**

BCLC sınıflandırması çok erken (0) ve erken evre (A) olan ve cerrahi rezeksiyon kriterlerini karşılamayan hastalar ablasyon için uygundur (Galle et al., 2018; Marrero et al., 2018). Ablasyon, radyofrekans ablasyon (RFA), kriyoterapi, mikrodalga veya lazer tedavisi ya da etanol, kaynar salin ve asetik asit gibi kimyasal maddelerin enjeksiyonu kullanılarak lokal tümör sıcaklığının değiştirilmesidir. Radyofrekans ablasyonun, 2 cm'den büyük tümörleri olan hastalarda perkütan etanol ve asetik asit enjeksiyonuna kıyasla daha üstün ablatif tedaviye sahip olduğu gösterilmiştir. Ablasyon ile cerrahi rezeksiyona kıyasla daha az komplikasyon ilişkilendirilmiştir (Asafo-Agyei & Samant, 2023).

### **Transarteriyel tedaviler**

BCLC orta evre (B) olan hastalar için transarteriyel tedaviler düşünülmektedir. Orta evre (B) karaciğer fonksiyonu korunmuş, ECOG-PS 0 ve makrovasküler invazyon veya ekstrahepatik yayılım olmaksızın multinodülerdir. Transarteriyel kemoembolizasyon (TACE), sitotoksik

ajanların intraarteriyel infüzyonu ve ardından tümöre giden besleyici arterin embolizasyonudur. TACE dekompanse sirozu olan hastalarda kontrendikedir. Metanaliz, %52,5'lik bir objektif yanıt oranı ve 1, 3 ve 5 yılda sırasıyla %70,3, %40,4 ve %32,4'lük bir genel sağkalım ortaya koymuştur (Lencioni et al., 2016). Selektif internal radyasyon tedavisi (SIRT), radyoizotop itriyum-90 mikrokürelerinin intraarteriyel infüzyonudur. Bu, BCLC orta evre (B) hastaları için düşünülmektedir (Sapisochin et al., 2017; Yoon et al., 2013). BCLC ileri evre (C) hastalarında hiçbir fayda gösterilmemiştir (Asafo-Agyei & Samant, 2023).

### **Sistemik kemoterapi**

Sorafenib, karaciğer fonksiyonu korunmuş, ECOG-PS skoru 1-2 olan ve makrovasküler invazyon veya ekstrahepatik yayılımı olan BCLC ileri evre (C) hastaları için ilk basamak tedavidir. Sorafenib bir multikinaz inhibitörüdür. Sorafenib hepatosellüler karsinom değerlendirme randomize protokolü (SHARP) çalışması, plasebo grubundaki 7,9 aya kıyasla sorafenib alan hastalar için 10,7 aylık bir medyan sağkalım göstermiştir (Llovet et al., 2008). Ayrıca, sorafenibin Asya-Pasifik bölgesinde ileri HCC hastalarında etkili olduğu gösterilmiştir (Cheng et al., 2009). Sorafenibin yaygın yan etkileri arasında palmar-plantar eritrodizestezi, diyare, kilo kaybı ve hipertansiyon bulunmaktadır. Lenvatinibin sorafenibden üstün olmadığı ancak noninferioritesi gösterilmiştir (Kudo et al., 2018). Lenvatinib, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından ilerlemiş HCC'nin birinci basamak tedavisinde ikinci ajan olarak onaylanmıştır. Lenvatinib, sorafenib ile karşılaştırıldığında belirgin kilo kaybı ile ilişkilidir ancak palmar-plantar eritrodizestezi daha azdır. Sorafenibi tolere edemeyen veya tümör progresyonu olan hastalara ikinci basamak tedavi başlanır. Bir multikinaz inhibitörü olan regorafenib, FDA tarafından ilerlemiş HCC için ikinci basamak tedavi olarak onaylanmıştır (Bruix et al., 2017). Diğer ikinci basamak ilaçlar arasında cabozantinib, ramucirumab ve programlanmış hücre ölümü 1 (PD-1) immün kontrol noktası inhibitörü olan nivolumab yer almaktadır (Abou-Alfa et al., 2018; El-Khoueiry et al., 2017).

### **4.2.6. Hepatosellüler karsinoma moleküler biyolojisi**

Hepatokarsinogenez, hepatositlerde etiyolojik faktörler nedeniyle meydana gelen kronik hepatitin ilk aşamaları ile başlar. Sonrasında karaciğer sirozu ile devam eden sürekli enflamasyon ve rejeneratif uyarılar sonucunda, hücre proliferasyonunu ve/veya apoptozunu kontrol eden genlerde meydana gelen genetik ve epigenetik alterasyonlar ile çoklu sinyal ileti yollarındaki disregülasyonları kapsayan çok basamaklı bir süreç olarak kabul edilmektedir (El-Serag & Rudolph, 2007; Thorgeirsson & Grisham, 2002).

HCC patolojisinin karmaşıklığı, başlangıcı ve gelişimi için ana nedensel ajanları belirlemeyi zorlaştırmıştır (Venook et al., 2010). Hastalığın gelişmesinde ve ilerlemesinde farklı protein kodlayan genlerin rolleri olduğu gösterilmiştir. Bu genler, hücre döngüsü, apoptoz, DNA hasarı ve hücre sinyallemesinin düzenlenmesinde yer alan genleri içerir. Bununla birlikte, bu genlerin ekspresyon kalıpları arasında bir uyumsuzluk vardır ve bu, HCC'ye dâhil olan genler için bir model oluşturmayı zorlaştırmıştır (Röcken & Carl-McGrath, 2001).

Karaciğerin normal yaşlanma sürecinde nadiren karşılaşılan kronik karaciğer hasarı, hepatokarsinogenez ile oldukça ilişkilidir. Bu ilişki, hücrel transformasyon gelişimine neden olan hücre bölünmesi kaynaklı olarak açıklanabilir. Ancak, insan HCC vakalarında replikasyon hatası frekansının oldukça az olması, bunun temel mekanizma olmadığına işaret etmektedir. Bunun yerine, kromozom kopya sayısı alterasyonları ve translokasyonların prevalansı oldukça yüksektir (Aravalli et al., 2008; Kawai et al., 2000).

Hepatokarsinogenez ile en ilişkili durum, uzun süreli (20-40 yıl) kronik karaciğer hastalığı sonucunda meydana gelen sirozdur. Kronik karaciğer hastalığı döneminde HCC riski düşük seyrederken, siroz evresinde ekspanansiyel olarak artış göstermektedir. Bu evrede karaciğerde tümör oluşumu üç temel mekanizma ile gerçekleşmektedir: kromozomal instabiliteye neden olan telomer disfonksiyonu; hücre döngüsü kontrol noktalarının (checkpoints) aktifleşmesi nedeniyle hepatosit proliferasyonunda azalma; karaciğer mikro ve makro çevre koşullarında tümör gelişimine neden olacak değişikliklerdir (El-Serag & Rudolph, 2007).

Yapılan çalışmalarda hepatokarsinogenezde meydana gelen çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin hücre proliferasyonu, hücrel sağkalım, farklılaşma ve anjiyogenez gibi hücrel sinyal ileti yolları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu yollar p53, retinoblastoma (Rb), Wingless/ $\beta$ -katenin (Wnt/ $\beta$ -katenin), transforming büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), MAPK, fosfatidilinositol 3-kinaz/v-akt murine thymoma viral onkogen homolog (PI3K/Akt), Rapamisinin Memelilerdeki Hedefi (mTOR) ve Janus kinaz /sinyal iletili ve transkripsiyon aktivatör (JAK/STAT) yollarını kapsamaktadır. Farklı etiyolojik faktörlerin farklı yollardaki genetik değişiklikler ile ilişkisi gösterilmiştir (Kumar et al., 2011; Nishida & Goel, 2011).

Proliferasyon sınıfındaki HCC'ler (vakaların ~%50'si) yüksek AFP seviyeleri, kötü klinik sonuç ve HBV ile ilişkili etiyoloji ile ilişkilidir. Bu tümörler MAPK sinyali, PI3K/AKT/mTOR sinyali ve Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü (MET) sinyali dahil olmak üzere hücre çoğalması ve sağkalımında rol oynayan sinyal yollarının aktivasyonunu gösterir (Boyault et al.,

2007; Chiang et al., 2008; Hoshida et al., 2009), TP53 mutasyonları ve *FGF19/CCND1* (Chiang et al., 2008; Wang et al., 2013) dahil olmak üzere 11q13 lokusundaki fokal kromozomal amplifikasyonlar bakımından zenginleşir ve yüksek kromozomal instabilite barındırır (Bassaganyas et al., 2020).

HCC'nin moleküler patogenezi, etiyoloji ve coğrafyaya bağlı olarak değişiklikler gösterse de vakaların %80'inde görülen kronik inflamasyonun karaciğer mikroçevresini değiştirmesiyle genotoksik hareketlerin karsinogenezde kritik rol oynadığı söylenebilir (Kumar et al., 2011). İnflamatuar hücrelerin sitokinleri, serbest oksijen türevleri, nitrik oksit ve benzeri ürünler rejeneratif yanıtı indüklerken, transkripsiyonel düzeyde organizmayı genetik değişkenliklere yatkın ve duyarlı hale getirir (Kumar et al., 2011; Rossetto et al., 2019). Bununla beraber karaciğer karsinogenezi söz konusu olduğunda iki modelden bahsetmek mümkündür. Bunlardan ilki klonal evrim modeli iken bir diğeri ise kanser kök hücre modelidir. Klonal evrim modeli, doku ekosisteminin adaptif mekanizmaları içinde tekrarlayan klonal genişleme ve seçim süreci ile ortaya çıkar. Karaciğer söz konusu olduğunda özellikle kronik inflamatuvar zeminde gelişen prekansöröz lezyonlardan, metastatik lezyona varıncaya dek tümör gelişimini çok aşamalı genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesinin bir sonucudur (Kumar et al., 2011).

Kanser kök hücre modelinde, doku onarımında rol alan, dokuları yenileme potansiyeline sahip progenitör (öncül) hücreler dikkati çeker (Dalerba et al., 2007). Tek bir kök hücreden çimlenen kanser hücresine rağmen HHC'lerde tümör heterojenitesi görmek mümkündür. Hepatositlerin rejeneratif potansiyeli, somatik mutasyonlar, sürücü mutasyonların farklı birikimi ve tümör mikroçevre varyasyonları tümör heterojenitesini açıklamakta kullanılan argümanlardır (Dalerba et al., 2007; Kumar et al., 2011).

HCC'de sürücü gen mutasyonlarında, sıklıkla tekrarlayan ve değişen onkogen etkiye veya tümör süpresör etkiye sahip kanser sürücü genleri tanımlanmıştır (Couri & Pillai, 2019). Bu sınıflandırma büyük oranda genomik, epigenomik, histopatolojik ve immünolojik analizler sonucu elde edilen verilere dayanan verilerle oluşturmuştur. Son dönemde ise HCC'de kullanılan moleküler sınıflandırma ve ilişkiler, temel moleküler sürücüler ve ana yollar üzerinden yapılmaktadır.

### **TERT promotör mutasyonları**

Farklı etiyolojilerde ve %80 kadar sıklıkta, en erken görülen olgu, uzayan telomeraz aktivasyonudur. Yaklaşık %60 oranda görülen TERT promotör mutasyonları, sirotik

karaciğerlerden gelişen HCC’lerde erken dönemde gözlenirken, bunun tekrarlayan ve yaygın somatik değişiklik olduğu söylenebilir. Ek olarak %5-6 düzeyde TERT amplifikasyonu ve %1-2 düzeyinde görülen TERT translokasyonundan da bahsedilebilir. TERT amplifikasyonu HBx proteinin, TERT promotör bölgesine entegrasyonu ile görülmesi, HBV-HCC vakalarında dikkat çekici bir olgudur (Couri & Pillai, 2019). Bu aktivasyonu teşvik eden mekanizmalar TERT promotör mutasyonları, viral eklemeler (insersiyon), translokasyon veya amplifikasyonlar olabilmektedir.

### **Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı**

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının HCC’lerde de aktifi rol oynadığı gösterilmiştir. HCC’lerin yaklaşık %30 kadarı ise Wnt sinyal yolağındaki inhibitörlerin adenomatöz polipozis koli (APC), *AXIN1* mutasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu inhibitörlerden özellikle APC’nin  $\beta$ -katenin yıkım kompleksi olarak görev yapmaması ve *CTNGB1* geni tarafından  $\beta$ -katenin farklı seviyelerde eksprese edilmesiyle, sitosolde ve farklı lokalizasyonlarda birikmesiyle kendini gösterir (Moon, 2005). Bilhassa  $\beta$ -katenin, transkripsiyon faktörleri ailesinden T-hücre faktörü/lenfoid güçlendirici faktör (TCF/LEF) proteinlerine bağlanarak çekirdekte belirli transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girer (Khalaf et al., 2018; Kumar et al., 2011).

### **TP53 geni**

HCC karsinogenezinde yaygın olarak karşılaşılan bir başka mekanizma ise P53 tümör süpresör gende görülen somatik mutasyonlarıdır. HCC’de görülen *TP53* mutasyonu kötü prognoza sahiptir ve Fibroblast Büyüme Faktörü 19 (FGF19) veya Siklin D1 amplifikasyonları ile birlikte HBV-HCC’lerde daha sık karşılaşırlar (Kumar et al., 2011). Hücre döngüsünü durdurmakta, apoptozda, yaşlanma ve hücre hasar yanıtında önemli bir protein olan P53’ü kodlayan *TP53* geni, dış faktörlerle tetiklenen karsinogenezi önlemede önemli bir mekanizmadır (Kumar et al., 2011).

HBV ve HCV kaynaklı kronik infeksiyon, reaktif oksijen radikallerinin açığa çıktığı hemokromatozis hastalığı gibi etmenler *TP53* mutasyonlarının görüldüğü DNA hasarına neden olur (Hussain et al., 2007). Tümör süpresör mekanizmasındaki bozukluklar, hücre döngüsünün işleyişinde düzensizliğe neden olan birçok sürecin aktive olmasına yol açar.

Özellikle HBV’nin HBx olarak bilinen viral proteini kodladığı ve bu proteinin p53’e spesifik olarak bağlandığı ve bu yolla p53 ile indüklenen apoptozu baskıladığı bilinmektedir (Kumar et al., 2011).

## **Myc protoonkogenler**

Genel olarak HCC'lerde *c-Myc*'nin aşırı eksprese edildiği görülür. C-Myc, proto onkogen ailesinin bir üyesi ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan, düzenleyici bir genidir. Kronik karaciğer hastalıklarında *c-Myc* ekspresyon seviyelerinin yüksek seyretmesi ve HCC'lerde sıklıkla *c-Myc* amplifikasyonu tanımlanması HCC karsinogenezindeki rolünün ortaya konmasında önemli olmuştur (Lin et al., 2010). Bu olgular Wnt/ $\beta$ -katenin etkinliğinde, *Myc*'nin aşırı eksprese edilmesi arasında ilişki kurulmuştur. *Myc*'nin HCC karsinogenezinde artan ekspresyon düzeyi ile TERT'in indüklediği ve bu yolla hücre yaşlanması atlanarak kanserleşmeye katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Kumar et al., 2011; Lin et al., 2010). Anjiyogenezde rol alan *VEGFA*'nın ekspresyon düzeyi artacak şekilde, özellikle hipoksi sırasında *c-Myc* ve *HIF-1 $\alpha$*  ile etkileşime girerek anjiyogenezini indüklediği de ortaya konmuştur (Lin et al., 2010).

## **PI3K/PTEN/Akt sinyal yolağı**

Hücre proliferasyonu, hücre metabolizması ve apoptoz gibi süreçlerin kontrolünde yer alan bir diğer mekanizmadan, PTEN/PI3K/AKT sinyalleşmesini düzenleyen önemli bir yolağın varlığından da bahsetmek gerekir (Carnero et al., 2008; Georgescu, 2010). PI3K-Akt yolu, kanserde aktive olan hayatta kalma yolu olması, tümör oluşumuna önemli ölçüde etki eden PI3K ve PKB/Akt aktivasyonunun keşfedilmesi, bu yolun düzenlenmesine yönelik araştırmaların artmasına ve nihayetinde, negatif düzenleyici olarak görev yapan fosfataz ve tensin homologunun (PTEN) keşfedilmesiyle sonuçlanmıştır (Georgescu, 2010). Bu özeliğiyle PTEN tümör baskılayıcı, somatik kanserlerde inaktivasyon için ortak hedef molekül seçilmiştir. Akt'nin aktivasyonu veya inaktifliği, hücrenin hayatta kalması, büyümesi ve proliferasyonu gibi hücresel süreçlerin ilerlemesinde etkili olur. Bu işlevi yerine getirmede çok sayıda Akt, fosforilasyon hedefi aracılığıyla sinyalleşmeyi tetikler ve fosfoinositid-3-kinaz'ın (PI3K) rol aldığı çok aşamalı bir mekanizma ile kontrol edilir. *PTEN* tarafından eksprese edilen PTEN protein Akt için negatif düzenleyici rolündedir (Georgescu, 2010).

## **Epigenetik modifikasyonlar**

Epigenetik modifikasyonlar, mutasyonlar gibi nükleotit dizi değişikliklerinden farklı olarak gen ekspresyon düzeyine etki eden DNA metilasyonu, miRNA düzeyi gibi çeşitli mekanizmalarla kendisini gösteren değişikliklerdir. Özellikle oldukça iyi araştırılan DNA metilasyonu ve miRNA etkinliği gibi epigenetik modifikasyonlar HCC'lerin %25-50'sinde karsinogeneze katkı verdiği ve süreci güçlendirdiği çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur (Fan et al., 2018; Rebouissou & Nault, 2020). Bir transkripsiyon düzenleyicisi rolüyle, hücresel sinyallere yanıt

olarak gelişen DNA metil transferaz (DNMT) aktivitesi, histonların lizin ve arginin spesifik metilasyonunu gerçekleştirerek gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde etkin görev yapar (An, 2007; Stallcup, 2001). Genellikle somatik hücrelerde, CpG dinükleotitlerinde gerçekleşen bu olay, DNMT aktivitesiyle S-adenosil metyonin gen promotör bölgeleri ve düzenleyici bölgelere metil gruplarının sitozin bazlarına aktarılma sürecidir (Toh et al., 2019). Gen ifadesinde önemli işlevi yerine getiren CpG adaları, kısa tekrar dizileri ve yaklaşık 2 kb'lık bir bölümü de içine alan daha düşük CpG içeren bölgeyi tanımlar. Tüm promotörlerin %50'si bu adacıklardan oluşur. Promotör bölgede bulunan CpG adacıklarında sitozin bazlarının hipermetilasyonu veya hipometilasyonu ile genin uzun süreli susturulması veya aşırı ifade edilmesi indüklenir. Birçok kanser türünde DNA üzerindeki metilasyon düzensizlikleri görülmektedir. Hipometilasyon genom yapısında kararsızlığa, mutasyonların görülme sıklığının artmasına ve translokasyonlara neden olabilmekte, transkripsiyon faktörlerini indükleyebilmektedir. HCC'lerde ise tümör süpresör genlerin hipermetilasyonu ile gen ifadesinin susturulması ya da azalması karsinogenezde önemli yer tutar (Fan et al., 2018; Nagaraju et al., 2022; Toh et al., 2019)

DNA metilasyonları kadar histon modifikasyonları da epigenetik mekanizmalar içinde önemli ağırlığa sahiptir. Bu mekanizmaları histon metilasyonu, histon asetilasyonu ve histon fosforilasyonu olarak özetlemek mümkündür. Histon olarak adlandırılan bu protein bileşim, ökaryotik kromatin mimarisinde önemli yer tutar. DNA, bu dört *domain*'den oluşan protein yapının etrafına sarılarak histonu, nükleozomu ve kromatini oluşturur. Özellikle histon kuyruğunun modifikasyonu, translasyon sonrası yüksek dereceli kromatin mimarisinin düzenlenmesindeki mekanizma olarak karşımıza çıkar (Braghini et al., 2022; Iwasaki et al., 2013). Histon metilasyonu ve asetilasyonu dışında histon fosforilasyonu bilhassa aktif gen transkripsiyonu ile karakterize edilen, özellikle Aurora kinazların H3 histon'un serin/treoninin fosforilasyonundan sorumlu olduğu ve yüksek dereceli tümörlerle korelasyonu bildirilmiştir (An, 2007; Braghini et al., 2022).

### **Tümör mikroçevresi**

Tümör mikroçevresini oluşturan immün sistem hücreleri ile HCC hücreleri arasındaki ilişki, gün geçtikçe daha çok ilgi gören ve çalışılan bir konudur. Tümör mikroçevresi hücrel ve hücrel olmayan unsurların bir arada bulunmasıyla oluşur. İmmün sistem hücreleri ve medyatörleri ile HCC arasındaki ilişki, HCC yi teşvik veya inhibe edici yönde olabilmektedir (Hao et al., 2021; Sevic et al., 2019). HCC'lerde de tümör ve mikroçevresi arasında karşılıklı ve devam eden bir etkileşim görülür. Tümör mikroçevresini oluşturan hücrel olmayan

unsurları ekstraselüler matriks barındırır. Hüresel unsurlar ise HCC hücreleri ve hepatik stellat hücreleri ile bu hücrelerin etkileştiği anjiyogenik endotel hücreler, fibroblastlar, adipositler ve immün sistem hücreleridir. Tümör mikroçevresinin karsinogenezi tetiklediği, tümörün ilerlemesini ve ilaç direncini büyük ölçüde etkilediği belirtilmiştir (Polidoro et al., 2020; Sevic et al., 2019).

HCC’de diagnostik ve prognostik biyobelirteçlerin tespiti için gerçekleştirilmiş birçok çalışma mevcut olsa da hastalığın etiyolojik kökeni baz alınarak oluşturulmuş homojen HCC hasta gruplarında gerçekleştirilmiş biyobelirteç taramaları oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, HCC hastalarında sağkalımı ve yaşam kalitesini iyileştirmek için HCC’nin erken teşhisi ve prognozu için yeni biyobelirteçlerin araştırılması acilen gereklidir (Chen et al., 2010; Sakamoto & Nagano, 2018). Son zamanlarda, miRNA’lar ve lncRNA’lar gibi ncRNA’lar, hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde gen ekspresyonunu düzenleyen HCC tanısı için potansiyel biyobelirteçler olduğu bildirilmiştir (Parizadeh et al., 2019; Qiu et al., 2017).

### **4.3. Kodlamayan RNA (ncRNA)**

1958’deki santral dogma önerisinden beri, RNA, DNA ve protein arasında bir ara ürün olarak kabul edildi ve bilim adamları DNA’nın mRNA’ya yazılımını takiben proteine çevirimini kapsayan ve sadece protein kodlayan genlerin varlığını kabul eden kanıya odaklanmışlardı (Dahm, 2008). 2004 yılında HAPMAP projesiyle, insan genomunda yaklaşık 20.000 protein kodlayan gen bulunduğunu, yani toplam genomik dizilerin %2-3’ünün proteine transkribe olduğu açıklandı. Bu durumda geri kalan %98’lik kısım junk DNA olarak adlandırıldı. Teknoloji ve yeni keşifler, hurda DNA’nın işlevsel olduğunun anlaşılmasına yol açmıştır ve genomun önemli bir bölümünün (~%70) RNA’ya okunduğu bilinmektedir (Diederichs, 2010; Katayama et al., 2005). Daha sonra RNA dizileme teknolojilerindeki gelişmeler, genomumuzun karmaşıklığını ortaya çıkarmıştır, protein kodlayan mRNA’lar, ve proteine çevrilmeyen RNA molekülleri kodlamayan RNA (*Non-coding* RNA) (ncRNA)’lar olarak adlandırılmıştır (Vitali et al., 2010). Kodlanmayan RNA’lar yazılım, kırılma, RNA düzenlenmesi, proteine çevirim, proteine çevirimin baskılanması ve mRNA yıkımı gibi birçok biyolojik süreçte rol almaktadırlar (Mattick, 2003). Ayrıca, kodlanmayan RNA kromozom dinamiğinin ve promoter bölgeye bağlanarak genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesine yer alan birçok aşamada rol almaktadırlar. RNA polimeraz II’nin kendisi kodlanmayan RNA uyarı iletimi ile düzenlenmektedir. Kodlanmayan RNA’ların kromatin yeniden şekillenmesinde ve epigenetik hafızada da önemli rollerinin olduğu tahmin edilmektedir ancak mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (Mattick & Makunin, 2005; Yang et al., 2001).

Kodlamayan RNA'lar genel olarak üç grupta toplanır. Birinci grup, klasik, yaşamsal ("*housekeeping*") RNA'lar adını verdiğimiz ve hücrede protein sentezi başta olmak üzere birçok metabolik süreçte yer alan ribozomal RNA'lar (rRNA'lar), taşıyıcı RNA'lar (tRNA'lar) ve küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar) protein sentezi başta olmak üzere hücresel birçok işlemlerin kritik bileşenleridir. İkinci grubu oluşturan RNA'larda, düzenleyici RNA'lar olarak adlandırılır. Bu grupta 200 bazdan uzun olanları uzun düzenleyici RNA'lar; uzun kodlamayan RNA ("*long non-coding RNA*", lncRNA)'lar ve 200 bazdan kısa olanlar, kısa kodlamayan ("*short noncoding RNA*") (sncRNA) olarak sınıflandırılır. Kodlamayan kısa düzenleyici RNA'lar; mikroRNA (miRNA), piwi ilişkili RNA (piRNA), küçük interferens RNA (siRNA) yer alır. Son yıllarda düzenleyici RNA'lara, promotör ile ilişkili RNA'lar ve kuvvetlendirici (enhancer) RNA'lar olmak üzere iki yeni üye daha eklenmiştir. Yeni kodlamayan RNA'ların keşfi, snoRNAs, CRISPR, Xist ve diğerlerinin tanımlanması ile devam etmektedir (Eddy, 2001).

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) gen ekspresyonunu transkripsiyonel veya transkripsiyon sonrası seviyelerde düzenleyebilen, yüksek oranda korunmuş, kararlı ve bol miktarda bulunan bir RNA sınıfıdır. Yapılan çalışmalar, ncRNA'ların hücre bölünmesi, hücre yaşlanma, hücre ölüm, mutasyon ve RNA düzenlenmesi gibi birçok biyolojik süreçte tahmin edilenden daha fazla ve geniş yelpazede görevlerinin olduğunu ileri sürmektedir (Bozgeyik et al., 2016; Doudna & Batey, 2004). Bu RNA dünyasının önemini anlamak, bugün biyolojinin karşılaştığı en önemli zorluklardan biridir. Özellikle ilgi çekici olan, insan hücrelerinde bugüne kadar tanımlanmış olan ncRNA sayısının protein kodlayan gen sayısından fazla olduğudur ki bu, ncRNA'ların yüksek ökaryot kompleksliğine önemli ölçüde katkıda bulunabileceğine işaret eder. Kodlayıcı olmayan RNA'lar, potansiyel yeni biyobelirteçler ve ilaç hedeflerinin bir altın madenini temsil eder. Tablo 1'de insanlardaki kodlanmayan RNA'ların çeşitleri ve sembolleri gösterilmiştir (Gibb et al., 2011).

Özellikle miRNA'lar son dönemde yoğun şekilde incelenmiş, tanı ve prognoz açısından önemli bir biyobelirteç olabileceği ifade edilmiş ve bu niteliği ile öne çıkmıştır (Lin et al., 2015; Yang et al., 2018). HCC karsinogenezi ile ilişkilendirilen bir başka moleküler yapı, gen ifadesinin düzenlenmesinde transkripsiyon sonrası, translasyon düzeyindeki ifadeyi modüle eden ve düzenleyici etkileri olan, tek sarmal, kodlamayan küçük endojen moleküllerin anormal ekspresyonudur (Morishita et al., 2021). Karsinogenezde rol alan miRNA'lar onkojenik ve tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak gruplandırılmıştır. Tümör baskılayıcı miRNA'lar onkojen ekspresyonunu inhibe ederken kanser hücrelerinde rastlanmaz. Onkojen miRNA ise, hücrelerde tümör baskılayıcıları inhibe eder ve karsinogenezi indüklerler. Bu özellikleri, miRNA'ların

HCC’lerde de bir biyobelirteç ve tedavide hedef molekül olarak seçilmesi araştırmalarında etkili olmuştur (Sui et al., 2016; Xu et al., 2018; Yerukala Sathipati & Ho, 2020).

**Tablo 1.** İnsan kodlamayan RNA’larının çeşitleri

Çeşit	Alt sınıf	Ad	Sembol		
Klasik, yaşamsal (“housekeeping”) RNA		Taşıyıcı RNA	tRNA		
		Ribosomal 5S ve 5.8S RNA	rRNA		
		Ribosomal 18S ve 28S RNA	rRNA		
		Küçük nükleer RNA	snRNA		
		Küçük nükleolar RNA	snoRNA		
Düzenleyici Kodlamayan RNA	Küçük kodlamayan RNA (18-200 nt uzunluğunda)	MicroRNA	miRNA		
		Small interfering RNA	siRNA		
		Piwi etkileşimli RNA	piRNA		
		Tiny transcription initiation RNA	tiRNA		
		İnsan Y RNA	hY RNA		
		3’UTR-türevli RNAs	uaRNA		
		Promoter-associated short RNA	PASR		
		Sonlanma ilişkili küçük RNA	TASR		
		Retrotransposon-türevli RNA	RE RNA		
		Küçük Endojen İnterfering RNA	endo-si RNA		
		Small NF90-ilşikili RNA	snaR		
		Vault RNA	vtRNA		
		Diğerleri			
		Uzun kodlamayan RNA (200 nt- >100 kb boyutunda)		İntronik uzun kodlamayan RNA	lncRNA
				Uzun veya büyük intergenik ncRNA	lincRNA
Enhancer RNA	eRNA				
Promoter ilişkili uzun RNA	PALR				
Doğal Antisense RNA	NAT				
Circular RNA	circRNA				
		Promoter upstream transkript	PROMPT		

Son zamanlarda, bazı ncRNA’ların HCC teşhisi ve prognozu için potansiyel biyobelirteçler olduğu belirlendi. Ayrıca, bazı ncRNA’ların hücre çoęalmasý, göç, istila ve metastaz, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve ayrıca apoptoz dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyerek HCC ilerlemesinde onkojenik veya baskılayıcı roller oynadığı bulunmuştur. HCC teşhisi tipik olarak biyopsi ile teyit edilen klinik parametrelere dayanır. Bu nedenle, objektif bir tanı sağlamak için invaziv olmayan biyobelirteçler gereklidir. Prognostik ve prediktif belirteçlerin belirlenmesi, hastaların yönetimini iyileştirmek ve mortalite oranını azaltmak için büyük önem taşımaktadır. Umut verici biyobelirteçler, etkili terapötik ilaç hedeflerine ve ilaçlara yol açabilir.

#### **4.3.1. Mikro RNA (miRNA)**

MiRNA'lar küçük (18-24 nükleotid) kodlayıcı olmayan RNA'lardır. MiRNA'lar hedef aldıkları genin mRNA'sının translasyonunu inhibe ederek, 5'şapka veya 3'poli A kuyruğu yapılarını bozarak veya ekzonükleaz aracılı mRNA degradasyonu yaparak regülatör görevi görürler (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011; Lewis et al., 2005). MiRNA veri tabanı miRBase göre, 1872 öncü ve 2578 insan olgun miRNA dizisi yayınlanmıştır (<http://www.mirbase.org>) (Singh et al., 2013). Tek bir miRNA çok sayıda mRNA'yı düzenleyebilir (yaklaşık 200) ve her mRNA birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir (Palumbo et al., 2014). Genel olarak, tüm insan genlerinin en az %20'sinin protein üretiminin miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir (Chen et al., 2004). Gen düzenlemesini etkileyerek, miRNA'ların hücresel proliferasyon ve apoptozis (Mathieu & Ruohola-Baker, 2013), kök hücre farklılaşması (T. Li et al., 2013; Marrone & Ho, 2014), organ gelişimi ve morfogenezi gibi çeşitli biyolojik işlemlerin kontrolüne katıldığı bilinmektedir (Raisch et al., 2013). Ayrıca miRNA ekspresyonu düzensizliği ile kanserin indüksiyonu arasında kuvvetli bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Bronevetsky & Ansel, 2013). MiRNA'lar doğuştan gelen ve adaptif immün sistemde önemli düzenleyici rollere sahip olup (Iborra et al., 2012; Wu et al., 2008) karakteristik miRNA ekspresyon profilleri HCC'de gösterilmiştir. Bazı miRNA'ların, HCC'de dâhil olmak üzere çeşitli kanserlerin patogenezinde rol oynayan genlerin ekspresyonunu etkilediğini ve bu hastalıklarda önemli bir rol oynayabilecekleri öne sürülmüştür (Weidle et al., 2020).

#### **4.3.2. Uzun kodlamayan RNA (lncRNA)**

Kodlamayan RNA'lar arasında belkide en gizemli grup yakın zamanda keşfedilen 200 nükleotidden daha uzun kodlamayan RNA molekülleridir. LncRNA'lar çoğunlukla RNA polimeraz II tarafından transkribe olan ve mRNA'ya benzer şekilde transkripsiyon sonrasında 5'ucunda 7-metilguanozin şapkası, splicing ve 3'ucunda poli-A kuyruğu eklenmesi gibi modifikasyonlara uğrayan RNA molekülleridir (Frankish et al., 2019). LncRNA'lar hayvanlar, bitkiler, maya, prokaryotlar ve hatta virüsler dâhil olmak üzere çok çeşitli türlerde gözlenir. Hücrede nükleer veya sitozolik kısımlar içinde bulunabilirler (Derrien et al., 2012). GENCODE sitesinde yayınlanan son verilerde uzun kodlamayan RNA genlerinin sayısı 16066 ve uzun kodlamayan RNA bölgesi transkriptlerinin sayısı ise 29566'dır (Frankish et al., 2019). LncRNA'lar genomik lokasyonlarına göre intergenik, intronik, çift yönlü, sens veya antisens yönelimde olabilmektedir (Ponting et al., 2009). DNA ile ilişkilerine göre de enhancer ve promotör ile ilişkili lncRNA'lar, upstream anti-sense RNA ve telomerik tekrarlı RNA olarak farklı gruplandırılabilirler (St Laurent et al., 2015).

LncRNA'ların işlevleri ayrıntılı olarak henüz aydınlatılamamış olmasına rağmen epigenetik olarak transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlenmeler ile hücrel fonksiyonlara katıldıkları bilinmektedir (Wang & Chang, 2011). Normal gelişimde gereklidirler. LncRNA'ların embriyogenezde (Pauli et al., 2011), kök hücre biyolojisinde ve hücrel gelişimde (Guttman et al., 2011), X kromozom inaktivasyonunda (XCI), genomik imprinting'de, kardiyak gelişim ve fonksiyonunda, hematopoez ve bağışıklıkta, endokrin sistemlerinde, lipit metabolizması ve adipogenezde, retinal gelişimde (Khalil et al., 2009; Young et al., 2005) ve glukokortikoid aktivitesinde önemli biyolojik rolleri olduğu saptanmış ve gelişimsel, spesifik doku ekspresyon profilleri gösterilmiştir (Derrien et al., 2012; Wapinski & Chang, 2011).

LncRNA'ların ekspresyonları doku tipine, hastalık durumlarına ve zamana bağlı olarak değişebilir ve anormal ekspresyonları hastalıklara sebep olmaktadır. LncRNA'lar hücre farklılaşması, büyümesi, proliferasyonu, göçü ve apoptozu ile tümör metastazı gibi çeşitli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde kritik rol oynarlar (Wan et al., 2017; Wang et al., 2015). LncRNA'ların anormal ekspresyonu kanser, kardiyovasküler hastalıklar (Moseley et al., 2006), anemi (alfa-talasemi), insan spinocerebellar ataksi tip 8 (sca8) (Ranum & Cooper, 2006), miyotonik distrofiler (Esteller, 2011), Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar (Faghihi et al., 2008; Gupta et al., 2010), böbrek ve diyabetik hastalıklardan oluşan hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Huarte et al., 2010). Birçok lncRNA'nın kolorektal, meme, akciğer, prostat, mesane, hepatosellüler ve diğer kanser türlerinde düzensiz ifade edildiği bildirilmiştir (Gibb et al., 2011). LncRNA'ların hastalık tipine göre hücredeki ekspresyonları farklılık gösterdiğinden, diagnostik ve prognostik belirteç olarak kullanılırlar (Tian et al., 2015). LncRNA'larla ilgili çalışmalar genellikle kanserli dokularda yapılmıştır. Pek çok çalışmada LncRNA'ların kanserli dokuda epitel karakterli kanser hücrelerinin mezenşimal fenotip kazanmalarını sağlayarak tümör metastazına neden oldukları ortaya çıkarılmıştır (Xiao et al., 2016).

LncRNA'ların hastalık tipine göre hücredeki ekspresyonları farklılık gösterdiğinden, diagnostik ve prognostik belirteç olarak kullanılabilme potansiyellerine sahiptir (Tian et al., 2015).

Geçtiğimiz birkaç yıl içinde, lncRNA'ların birçok hastalığındaki işlevlerine ilişkin yeni bilgiler ortaya çıkmıştır. Birçok lncRNA, tahmin ve tanıdan hastaların tedavisi ve izlenmesine kadar klinik uygulamalar için umut verici dönüştürülebilir potansiyel göstermiştir. Biriken kanıtlar, anormal lncRNA ifadesinin çeşitli kanserlerde sıklıkla görüldüğünü ve çeşitli kanser türlerinin başlamasına ve gelişmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Gutschner & Diederichs,

2012; Spizzo et al., 2012). Ayrıca, çeşitli lncRNA'ların HCC progresyonuna katıldığı gösterilmiştir. Örneğin, lncRNA HULC, COX-2'yi stabilize ederek HCC hücrelerinin büyümesini teşvik edebilirken, lncRNA CASC2, HCC'deki MAPK sinyal yolunu düzenleyerek hücre biyolojik rollerini kontrol edebilir (Gan et al., 2017; Xiong et al., 2017).

#### **4.4. Hepatosellüler Karsinom'da Kodlamayan RNA'ların Önemi**

HCC üzerine yapılan araştırmaların çoğu geleneksel protein kodlayan genlerin gen ekspresyon modellerine odaklanmış olsa da birçok araştırma grubu son zamanlarda ncRNA'ların ekspresyona dayalı tanımlanmasını denedi (Zhu et al., 2014). Özellikle son yıllarda, HCC'de yer alan ve hala belirsiz olan moleküler süreçleri ve HCC'de yer alan ajanların anlaşılmasına biraz ışık tutabilecek, neden olan ncRNA'lara odaklanan araştırma miktarı giderek artmaktadır (Klingenberg et al., 2017). Bu çalışmalar, HCC'nin başlaması, ilerlemesi ve saldırganlığı üzerinde farklı ekspresyon kalıpları ve düzenleyici etkiler gösteren birkaç ncRNA keşfetmiştir (Zhu et al., 2014).

Farklı etnik gruplar ve farklı evrelerdeki HBV ve HCV ilişkili HCC'lerde yapılan gen ekspresyon çalışmalarında miRNA'ların birçok ekspresyon paterninin olduğu gözlenmiştir (Jiang et al., 2008; Ladeiro et al., 2008). MikroRNA (miRNA) profilleri, tümör sınıflandırması ve prognozu için oldukça bilgilendiricidir (Volinia et al., 2006). MiRNA'ların anormal ekspresyonu, artmış HCC riski, neoplastik gelişme, ileri evreler ve vasküler invazyon ile ilişkili bulunmuştur ve bazıları kemirgen modellerinde doğrulanmış ve terapötik hedefler olarak test edilmiştir (Balogh & Victor, 2016; Ferlay J, 2020; Kawai et al., 2000; Thorgeirsson & Grisham, 2002). Fonksiyonel çalışmalar, önemli onkojenlerin veya tümör baskılayıcı genlerin doğrudan hedeflenmesi yoluyla, hepatokarsinogenezi yönlendiren anahtar yolların düzenlenmesinde spesifik miRNA'ların aktif rol oynadığını göstermiştir (Kumar et al., 2011; Nishida & Goel, 2011). Bir çalışmada kromozom amplifikasyonu veya delesyonu ilişkili miR-151 onkojenik potansiyeli nedeniyle bir onkomir olarak tanımlanmıştır (Ding et al., 2010).

Son zamanlarda, miRNA'ların hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde gen ekspresyonunu düzenleyen HCC tanısı için potansiyel biyobelirteçler olduğu bildirilmiştir (Parizadeh et al., 2019). MiR-21, miR-122, miR 221/222, miR-520 ve miR-657 gibi mikroRNA'ların, HCC için umut verici biyobelirteçler ve terapötik hedefler olduğu gösterilmiştir (Braconi, Henry, et al., 2011; Meng et al., 2007; Pineau et al., 2010; Song et al., 2013).

Literatürde miRNA'ların mRNA'dan daha stabil olduğu gösterilmiştir, bu nedenle miRNA tespitinin klinik uygulaması, dokudan farklı olarak plazma veya serum gibi klinik örneklerde kolayca kullanılabilir. Birçok çalışma, HCC hastalarında dolaşımdaki miRNA profillerini karakterize etmiştir. Birçok regülasyonu değişmiş miRNA tanımlanmıştır, ancak adaylar ve bunların karşılık gelen tanısal doğrulukları çalışmalar arasında farklılık göstermektedir

Bazı miRNA'ların HBV ile ilişkili HCC, KHB hastaları ve sağlıklı bireylerin serum örneklerinde farklı şekilde ifade edildiği bildirilmiştir. miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a ve miR-801'in HCC, KHB ve sağlıklı bireylerin serum örneklerinde farklı şekilde eksprese edildiği bildirilmiştir (Xu et al., 2011; Zhou et al., 2011). MiR-21 ve miR-122, bağımsız olarak HCC'yi öngörebilen en umut verici miRNA çiftleri olarak öne çıkmaktadır. Mir-21, mir-122 ve mir-192, düşük AFP seviyeleri ölçüldüğünde bile HBV hastalarında yüksek HCC tanısal doğruluğu göstermiştir.

Önceki yapılan çalışmalar miRNA'ların HCC ilerlemede onkojenik veya tümör baskılayıcı faktörler olarak hareket edebileceğini göstermektedir (Liu et al., 2018; Ye et al., 2018; Zhang et al., 2015). Tüm sonuçlar, miRNA'ların kanser teşhisi ve ilerlemesi için bir belirteç haline gelebileceğini göstermektedir.

Uzun kodlamayan RNA'ların da önemli bir HCC düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. LncRNA'lar son zamanlarda genom dinamiklerini düzenlemede en önemli oyuncularından biri olarak ortaya çıktı bununla beraber HCC gelişiminde de önemli bir yere sahip oldukları gösterilmiştir. Ayrıca lncRNA, HCC tanılarında yeni bir biyobelirteç olarak da tanımlanmıştır (Ge et al., 2017). Çeşitli yapıları nedeniyle, lncRNA'lar işlevleri tam olarak çözülmemiştir ve birçok lncRNA hala işlevsel olarak karakterize edilmemiştir (Clark & Mattick, 2011). HCC'nin farklı aşamalarının düzenlenmesine katılımları, heyecan verici ve hızla gelişen bir araştırma alanıdır. Son zamanlarda, lncRNA'ların da HCC'de yüksek bir öneme sahip olduğu gösterilmiştir ve lncRNA H19, lncRNA HEIH, lncRNA HULC ve lncRNA MEG3'ü de içeren çok sayıda lncRNA HCC ile ilişkilendirilmiştir (Braconi, Kogure, et al., 2011; Matouk et al., 2007; Panzitt et al., 2007; Yang et al., 2011). LncRNA'lar karaciğer mikroçevresini ve kronik karaciğer hastalıklarını modüle eder. LncRNA'lar fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynarlar (Huang et al., 2020).

LncRNA'ların mükemmel doku özgüllüğü, farklı tümör alt sınıflarının sınıflandırılmasına ve hatta farklı klinik sonuçların tahmin edilmesine yardımcı olabilir. HCC'nin hem etimolojik farklılıkları ve patogenezindeki farklılıklar dolayısıyla, tümör doku ve serumunda lncRNA ekspresyonunun miktarının belirlenmesinin araştırılmasını teşvik etti. Bazı lncRNA'lar, kanser

hastalarında sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında oldukça spesifiktir ve tümörlerde çeşitli ekspresyon paternleri, onları plazma, kan ve tükürük gibi vücut sıvılarında tespit edilebilir hale getirerek, invazif olmayan tanısal biyobelirteçler olarak araştırılmasını sağlamıştır. Örneğin, ekspresyonu HCC hastaları için kötü klinik sonucu öngören HULC, HCC hastalarının kanında ve buna karşılık gelen tümör dokularında geleneksel PCR yöntemiyle tespit edilir. LncRNA-MVIH, lncRNA-H19, lncRNA-HEIH, lncRNA-HULC, lncRNA-TUC338, lncRNA-MEG3, MALAT1, LINC00152, RP11-160H22.5, Lnc-PCDH9-13:1 ve XLOC014172 dâhil olmak üzere birçok dolaşımdaki lncRNA, HCC ile ilişkilendirilmiştir (Huang et al., 2020; Wong & Wong, 2021).

Eksozomlar, vücut sıvısındaki enzimatik bozulmadan korunan tümöre özgü lncRNA'ları içerir ve bu da onları invazif olmayan biyobelirteçler için çekici alternatifler haline getirir. Ek olarak, LINC00853, lncRNA-ATB, LINC00511 gibi bazı eksozom türevi lncRNA'lar, HCC hastaları için prognostik faktörlerle ilişkilidir, bu da erken HCC için potansiyel tanısal biyobelirteç olduğunu gösterir. Yalnızca HCC'li 104 hastanın kan örneklerinde bulunan hücre dışı vezikül uzun RNA'ları (exLR'ler), HCC'yi tümör olmayan kontrollerden etkili bir şekilde ayırt edebilir (Wong & Wong, 2021).

LncRNA'larla ilgili çalışmalar genellikle kanserli dokularda yapılmıştır. Birçok lncRNA'nın hepatosellüler ve diğer kanser türlerinde düzensiz ekspresyonu bildirilmiştir. LncRNA'ların hastalık tipine göre hücredeki ekspresyonları farklılık gösterdiğinden, diagnostik ve prognostik belirteç olarak kullanılırlar. Serum ENSG00000258332.1, LINC00635, PVT1, uc002mbe.2, UCA1 ve WRAP53'ün AFP ile kombinasyonu tek başına AFP'ye kıyasla HCC tanısında daha iyi ayırt ediciliği gösterilmiştir (Yuan et al., 2021).

Pek çok çalışmada lncRNA'ların kanserli dokuda epitel karakterli kanser hücrelerinin mezenşimal fenotip kazanmalarını sağlayarak tümör metastazına neden oldukları ortaya çıkarılmıştır (Xiao et al., 2016). HCC'de mikro vasküler invazyonla ilişkili lncRNA'nın (lncRNA MVIH) up-regülasyonunun, başlangıçtaki HCC hastalarında kalıcı nüksü önemli ölçüde öngördüğü bulunmuştur; bu, MVIH'nin, HCC hastalarının erken tespiti için yararlı bir belirteç olabileceğini göstermektedir.

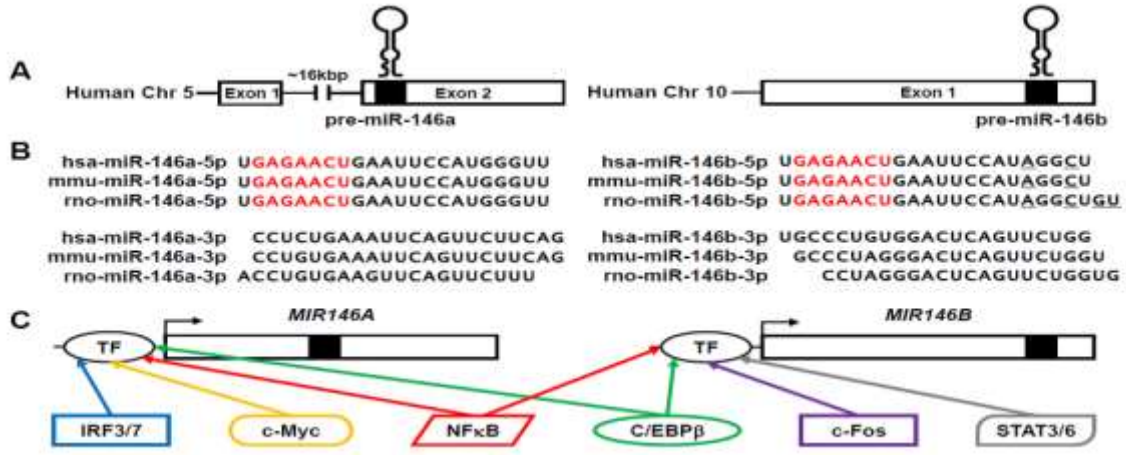
NcRNA ZFAS1 (çinko parmak antisens 1), HCC'nin saptanması için yeni bir serum tanısal belirteçidir. lncRNA ZFAS1, yüksek duyarlılık ve özgüllük değeri ile sirozlu hastalarda HCC için iyi bir tanısal belirteçtir, ancak ZFAS1'in HCC'li hastalarda prognostik önemi yoktur (Duan et al., 2020).

XLOC014172, LINC00152 ve RP11-160H22.5'in kombinasyonu, HCC hastalarını hepatit hastalarından ayırt edebilir (Yuan et al., 2021). Bütün bu araştırmaların sonuçları lncRNA'ların HCC tanısında biyobelirteç olabileceğini gösterir.

Farklı ncRNA'ları birlikte hedefleyen kombinasyonların geliştirilmesi, sadece miRNA ya da sadece lncRNA için gösterilenlerden daha iyi sonuçlar verebilir. H19, HCC'yi baskılayabilir ve aynı zamanda bir protein kompleksi hnRNP U / PCAF / RNA Pol II ile etkileşime girerek, histon asetilasyonunu artırarak miR-200 ailesini aktive eder (L. Zhang et al., 2013). MiR-29, HCC'de MEG3 lncRNA ekspresyonunu düzenler (Braconi, Kogure, et al., 2011). HULC, HCC'de farklı genlerin ekspresyonunu dolaylı olarak düzenleyen miR-372'yi inhibe eder (Wang et al., 2010).

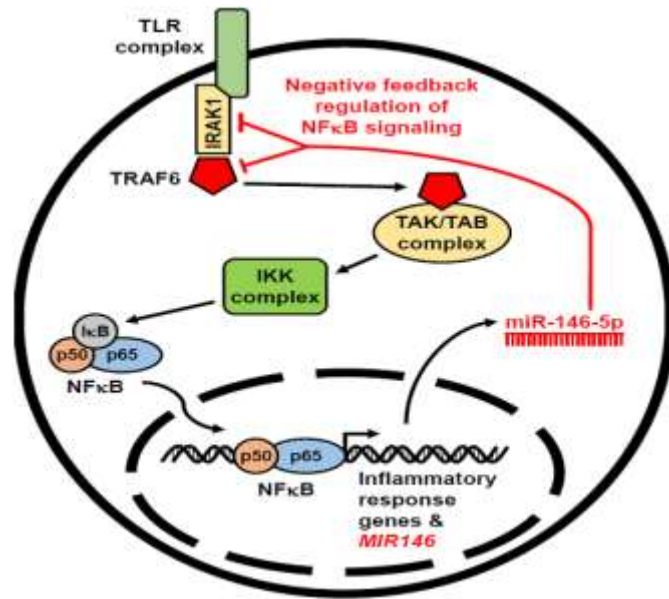
#### **4.4.1. miR-146b-5p**

İnsan miR-146 ailesi, iki üye gen miR-146a ve miR-146b'den oluşur. Bu iki miRNA, farklı kromozomlarda bulunur ve birçok durumda farklı düzenleme sergiler. Bununla birlikte, nükleotid sekansları neredeyse aynıdırlar, bu nedenle aynı gen setini hedefledikleri tahmin edilmektedir. İnsanda *MIR146A*, daha büyük bir uzun kodlamayan RNA konak geni olan *MIR3142HG* (kromozom 5q33.3) içinde bulunurken, *MIR146B* insan kromozomu 10'un (10q24.32) intergenik bir bölgesinde bulunur. Bu iki miR-146 üyesi için yalnızca olgun ipliğin 3'ucundaki iki nükleotid kadar farklılık gösterir (Paterson & Kriegel, 2017). Şekil 8 A'da miR-146 ailesi, sırasıyla insan kromozomları 5 ve 10'da bulunan miR-146a ve miR-146b olmak üzere iki üyeden oluştuğu gösterilmiştir. Öncü miR-146 dizilerinin yerini gösteren siyah kutular ve firkete yapıları ile insan genleri için temel ekson yapısı gösterilmiştir. Aynı şeklin B kısmında, yetişkin insanlarda, farelerde ve sıçanlarda hem miR-146a-5p ve -3p dizileri hem de miR-146b-5p ve -3p iplikler için diziler için gösterilmiştir. Sırasıyla miR-146a-5p ve miR-146b-5p için türler arasında yüksek dizi homolojisi vardır. MiR-146a-5p ve miR-146b-5p'nin her türde 3'ucunda yalnızca birkaç baz farklıdır (miR-146a-5p ve miR-146b-5p arasında farklılık gösteren nükleotidlerin altı çizilmiştir). Sırasıyla hem miR-146a hem de miR-146b için-3p dizileri türler arasında büyük ölçüde homolog iken, her tür içinde miR-146a-3p ve miR-146b-3p dizileri homolog değildir. Şekil 8 C kısmında ise hem *MIR146A* hem de *MIR146B*'nin promoter bölgelerindeki tahmin edilen ve bilinen transkripsiyon faktörü bağlanma yerlerinin bir şematığı (Paterson & Kriegel, 2017).



**Şekil 8.** miR-146 ailesi (Paterson & Kriegel, 2017)

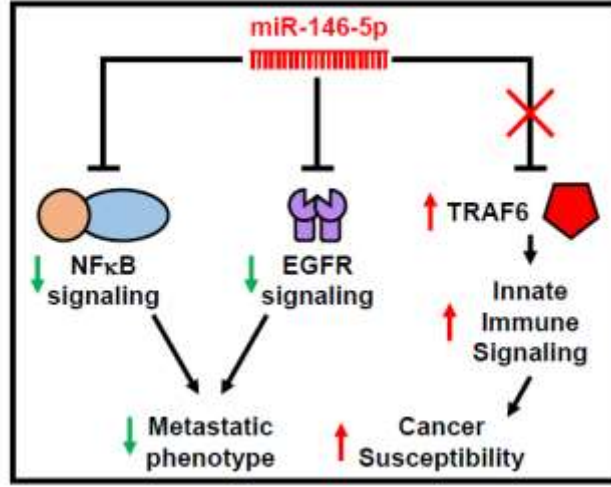
Yapılan bir çalışmada hsa-miR-146b'nin akciğer kanserinde ekspresyonunun azaldığı ortaya çıkarılmıştır (Backes et al., 2010). Bildirilen çalışmaların büyük bir kısmı, interlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz 1' i (IRAK1) ve tümör-nekroz-faktör-reseptör ile ilişkili faktör 6'yı (TRAF6), miR-146 ailesinin anahtar hedefleri olarak tanımlamaktadır (Bhaumik et al., 2009; Hou et al., 2009; Xiang et al., 2014). Xiang ve arkadaşları, miR-146b'nin NFκB yolağını negatif geri besleme düzenlenmesiyle tümör baskılayıcı rolünü vurgulamıştır ve miR-146b'nin ekspresyonundaki artışın tümörigenez üzerinde moleküler bir fren olabileceğini öne sürmüştür (Xiang et al., 2014)(Şekil 9).



**Şekil 9.** MiR-146' nın NFκB sinyal yolağındaki olası görevi(Xiang et al., 2014)

MiR-146 literatürünün büyük çoğunluğu, NFκB sinyallemesinin aracılık ettiği doğuştan gelen bağışıklık ve enflamatuar yanıtlara odaklanır. Toll benzeri reseptör kompleksinin (TLR) uyarılması, IRAK1 ve TRAF6'nın TAK / TAB kompleksi ile birleşmesine neden olarak IKK

kompleksinin daha sonra aktivasyonu ve NFκB'nin, enflamatuvar/immün yanıtı indüklediği çekirdeğe translokasyonu ile sonuçlanır. Bu da inflamatuvar yanıt genleri ve miR-146 ekspresyonunu indükler. MiR-146 daha sonra *IRAK1* ve *TRAF6* ekspresyonunu baskılayarak NFκB sinyallemede moleküler bir fren görevi görebilir (Xiang et al., 2014)(Şekil 10).



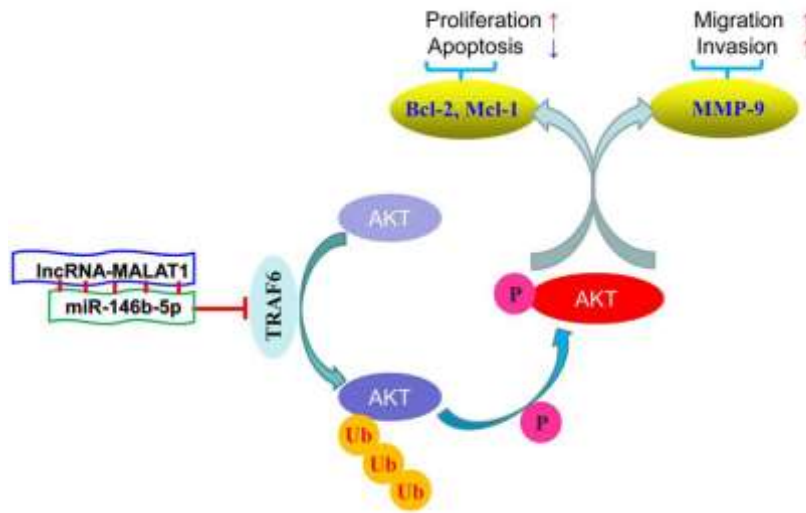
**Şekil 10.** Kanser fenotiplerinin miR-146-5p modülasyonunun üç basit yolunu gösteren diyagram.

Daha önce tartışılan NFκB sinyal yolunun çeşitli meme kanseri hücrelerinin metastatik fenotipini indüklediği gösterilmiştir. MiR-146a/b'nin artan ekspresyonu, NFκB sinyallemesini bloke eder ve bu nedenle bu metastatik potansiyeli azaltır. Ayrıca kanser ortamında miR-146b, hücrenin büyüme faktörü uyarısına tepkisini ayarlar. Trombositten türetilen büyüme faktörü, daha sonra epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyalini bloke eden ve böylece metastatik büyümeyi durduran miR-146b'nin ekspresyonunu artırır. MiR-146a, bir kromozomal anormallik (5q sendromu) nedeniyle kaybedildiğinde, *TRAF6*'nın anormal ekspresyonu, NFκB sinyalini indükler ve kanser duyarlılığını artırır (Xiang et al., 2014).

MiR-146b-5p'nin rolü birçok kanserde ortaya çıkarılmış olsa da, HCC'deki rolü ve işlevi hala belirsizdir. Bunu belirlemek için yapılan bir çalışmada miR-146b-5p'nin 4 farklı HCC hücrelerinde ve BALB/c nüde farelerinde tümör büyümesi, metastaz ve zayıf sağ kalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. MiR-146b-5p'nin proliferasyonu, göçü ve invazyonu baskılayabilir ve in vitro ve in vivo apoptozu indükleyebilir olduğu gösterilmiştir. Dahası *TRAF6*'nın HCC'de miR-146b-5p'nin doğrudan hedefi olduğunu beş farklı veri tabanı üzerinden gösterilmiştir. İn vitro olarak, miR-146b-5p'nin ekspresyonundaki artışın MHCC97-H hücrelerinde *TRAF6* mRNA ekspresyonunu inhibe ettiğini, Hep3B hücrelerinde miR-146b-5p'nin ekspresyonundaki azalmanın *TRAF6* ekspresyonunu indüklediğini ortaya çıkarılmıştır. MiR-146b-5p'nin *TRAF6* aracılı *p-Akt* fosforilasyonunu inhibe ederek tümör büyümesini ve

metastazını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Dört HCC hücre hattında (MHCC97-H, SMMC-7721, Hep3B ve HepG2) ve bir insan ölümsüz karaciğer hücre hattında (LO2) miR-146b-5p ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. MiR-146b-5p aşırı ekspresyonu MHCC97-H hücrelerinde *p-Akt* ekspresyonunu azaltırken miR-146b-5p knockdown, Hep3B hücrelerinde *p-Akt* ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (C. Li et al., 2017).

Ayrıca HCC dokularında Metastaz ile ilişkili akciğer adenokarsinom transkripti 1(*MALAT1*) uzun kodlamayan RNA'sının tümöre komşu dokularındakinden daha yüksek olduğunu bulmuşlar ve *MALAT1* ile miR-146b-5p arasında birbirine tamamlayıcı bir sekans olduğunu ve bu iki kodlamayan RNA arasında negatif bir ilişki tespit edilmiştir (C. Li et al., 2017). MHCC97-H ve SMMC-7721 hücrelerinde *MALAT1* ekspresyonunu siRNA ile susturulmasıyla miR-146b-5p'nin ekspresyonunu arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular, *MALAT1*'i miR-146b-5p'nin moleküler bir sponge (sünger) olarak tanımlanmış ve miR-146b-5p ifadesinin HCC'de neden daha düşük olduğunu açıklayabilir (C. Li et al., 2017). Bu çalışmada, ilk kez, miR-146b-5p ekspresyonunun HCC dokularında önemli ölçüde azaldığını keşfedilmiştir. Yukarıdaki sonuçların tümü, HCC'de miR-146b-5p'nin azalmış ekspresyonunun olumsuz bir faktör olduğunu ve hücre büyümesi ve metastaz bozukluğuna yol açabileceğini göstermektedir (C. Li et al., 2017)(Şekil 11).



**Şekil 11.** Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde tümör büyümesi ve metastazın miR-146b-5p aracılı durdurulmasının şematik gösterimi (C. Li et al., 2017)

HCC dokularında miR-146b-5p'nin ekspresyonundaki azalmanın malign klinik özellikler ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. İn vitro ve in vivo çalışmalar kullanılarak, miR-146b-5p'nin HCC'de tümör büyümesi ve metastazı için yeni bir inhibitör olduğu gösterilmiştir. miR-146b-5p'nin çoklu anti-kanser fonksiyonları *TRAF6/p-Akt* yolağının inhibisyonuna bağlıdır. Araştırmacılar miR-146b-5p'nin HCC'de yeni bir prognostik biyobelirteç ve potansiyel terapötik hedef olabileceğini öne sürmüşlerdir (C. Li et al., 2017).

HCV'nin immünopatogenezinde katkıda bulunabilecek ve HCV'ye özgü miRNA'ları belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada klinik örnekler ve in vitro analizler kullanarak kronik hepatit C virüs enfeksiyonunda 5 miRNA (hsa-miR181a-2-3p, hsa-miR-374a-3p, hsa-miR374a-5p, hsa-miR-204 5p ve hsa-miR146b-5p) belirlenmiştir. Bunlar arasında hsa-miR146b-5p'nin oranı (Periferik Kan Mononükleer Hücreler (PBMC) kaynaklı miRNA'lar / serum kaynaklı miRNA'lar) tüm miRNA'lar arasında en yüksek olduğu bulunmuştur. Daha önce tedavi görmemiş 30 Kronik Hepatit B (KHB) hastası, 30 tedavi almamış NASH, 50 tedavi almamış Kronik Hepatit C (KHC) hastası ve 15 sağlıklı kontrol dâhil edilmiş. Bunların serumlarında bulunan hsa-miR146b-5p'nin ekspresyonunun KHB hastaları ve sağlıklı deneklere kıyasla KHC hastalarında önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Seçilen 4 KHC hastasının PBMC'leri izole edilmiş ve validasyon (doğrulama) çalışmasında kullanılmıştır. KHC hastalarının CD3+T hücrelerinde ve CD14+ monositlerinde hsa-miR146b-5p ekspresyonu, diğer gruplardan önemli ölçüde daha düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hsa-miR146-5p, sitokin ekspresyonunu modifiye ederek kalıcı KHC enfeksiyonunun immünopatogenezinde katkıda bulunabildiği gösterilmiştir. Bu bulgular, spesifik miRNA ekspresyonlarının KHC hastalarında immün reaksiyonları etkilediğini kanıtlamaktadır. Birlikte ele alındığında analizler, HCV enfeksiyonunda bağışıklık tepkisinde miR-146b tarafından modüle edilecek en olası adayın NF-kB sinyali olduğunu öngördü. İlginç bir şekilde, String v10 programı kullanılarak miR-146b'nin hedef genlerinin ağ analizi, nükleer faktör-kappa B (NF-kB) sinyallemesinin merkezi katılımını gösterdi (Kondo et al., 2019).

Yapılan biyoinformatik bir çalışmada GSE20077 ve GSE108724 verisetlerinde, HCC tümör dokularındaki ve normal dokulardan miRNA ekspresyon profili analizi yapılmış. HCC tümör dokularında miR-146b-5p ekspresyonunda anlamlı bir azalma bulunmuştur; bu, miR-146b-5p'nin HCC'de bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir (Liu et al., 2022).

Bir araştırma grubu daha önce *HIF1* (Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1) in hepatosit fibrozunda ekspresyonun azaldığını bulmuşlar ve sıçanlarla yaptıkları bir sonraki çalışmalarında da HCC ve normal dokuda fibroz dokuya göre *HIF1*'in neden azaldığını araştırmışlar ve miR-146b-5p'nin *HIF1-2*'yi hedeflediği ve miR-146b-5p'nin hepatosit fibrozunda ekspresyonunun arttığı ve dolayısıyla miR-146b-5p'nin hepatit stellate hücrelerin aktivasyonunu ve çoğalmasını desteklediğini ve hepatosit fibrozunun düzenlenmesinde önemli bir etki gösterdiğini ortaya çıkarılmıştır. Mevcut çalışmada miR-146b-5p, hepatosit fibrozlu sıçanların karaciğer dokularında normal sıçanların karaciğer dokularına göre önemli ölçüde ekspresyonu artmıştır.

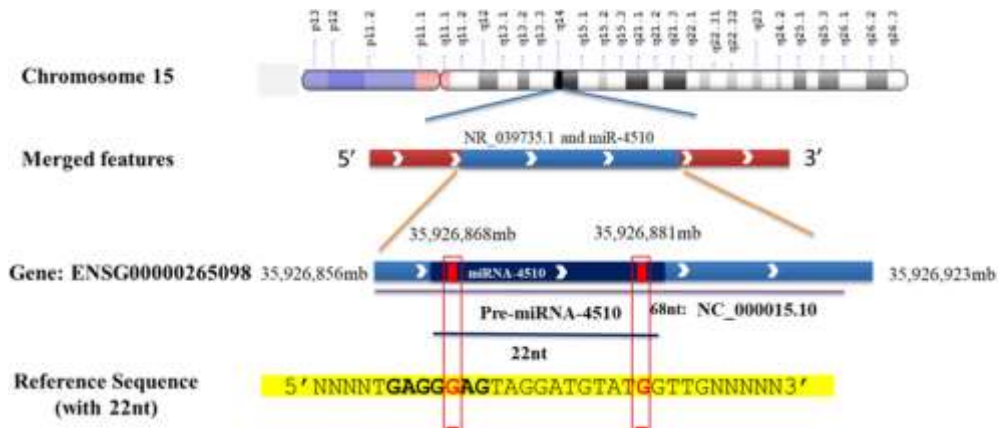
Bu da miR-146b-5p'nin fibrozun ilerlemesi sırasında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir ancak işlevi hala belirsizdir (Xie et al., 2022).

miR-146b-5p yi biyoinformatik olarak GEO ([Gene Expression Omnibus](#))'un iki veri setinde Alkolik Karaciğer Hastaları, Alkolik olmayan sterohepatit ve HCV hastalıklarının siroz ve normal dokuları karşılaştırıldığında miR-146b5p sirotik dokuda normale göre yaklaşık 2.5 kat ekspresyonu arttığı bulunmuş (Tai et al., 2021).

Başka bir çalışmada ekspresyonu en çok değişen miRNA'lar (yani miR-146a-5p, miR-26a-5p ve miR-191-5p) portal ve hepatik ven kanında ve karaciğer dokusunda değerlendirilmiştir, ancak anlamlı bir fark görülmemesine rağmen, sirozlu hastalardan alınan PBMC'ler, miR-26 ve miR-146a'nın önemli ölçüde ekspresyonunun azaldığını göstermiştir; bu bize dolaşımdaki bazı miRNA'ların ekstrahepatik kökenli olduğunu düşündürebilir (Blaya et al., 2021).

#### 4.4.2. miR-4510

İnsan 15. Kromozomunda bulunana miR-4510'un gen lokusunun şematik halini Şekil 12'ten gösterilmiştir.



Şekil 12. İnsan miR-4510'un gen lokusu

miR-4510'un HCC için başka bir yeni biyobelirteç olabileceğine dair güçlü kanıtlar vardır. miR-4510'un birçok proto-onkogeni hedef alarak karaciğerde güçlü bir tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı iddia edilmiştir (Jalvy-Delvaile et al., 2012; Maurel et al., 2013). *GPC3*, HCC'de aşırı eksprese edilen çok sayıda onkogenen biridir (Zynger et al., 2008) ve HCC'de açıkça ilgili bir moleküler hedef oluşturmaktadır (Hoshida et al., 2009). Yakın zamanda miR-4510'un *Glypican-3 (GPC3)* hedeflemesi ve *Wnt* yolu inaktivasyonu yoluyla HCC ve hepatoblastom büyümesini engelleme konusundaki olağanüstü kapasitesi ve miR-4510'un güçlü bir anti-tümör

molekölü olarak davrandığını bildirilmiştir (Cartier et al., 2017). MiR-4510'un, ekspresyonunu ve karaciğer kanseri üzerindeki fonksiyonel etkisini azaltarak *RAF1* proteininin onkogenik etkisini sınırladığını bulmuşlardır. Endojen miR-4510'un spesifik bir anti-miR ile bloke edilmesi ile de HCC hücre büyümesini arttırdığı bulunmuştur. HCC hücrelerinde miR-4510'un aracılık ettiği fenotipik değişikliklerin bir kısmı, şimdiye kadar bildirilen tek doğrulanmış miR-4510 hedefi olan *GPC3* ekspresyonuna bağlı olduğu ortaya çıkarılmıştır (Cartier et al., 2017).

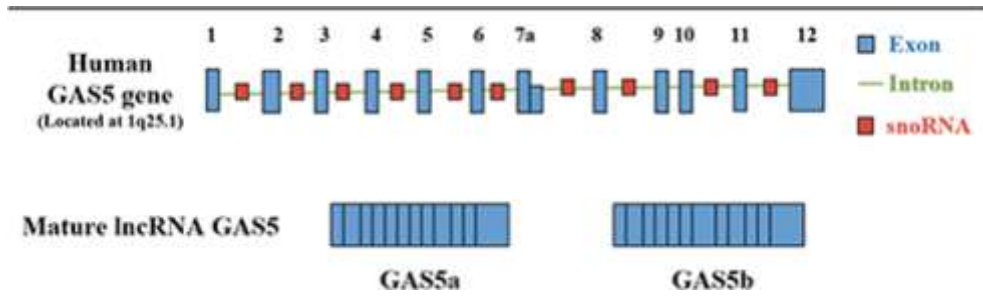
Başka bir çalışmada ise, miR-4510'un moleküler olarak karaciğer tümörü gelişimini inhibe etmek için nasıl davrandığını daha iyi anlamayı amaçlamışlardır. MiR-4510'un yeni hedeflerini belirlemek için, bir proteomik yaklaşımı kullanılarak ve miR-4510 tarafından *RAF* proto-onkogen serin/treonin-protein kinazın (*RAF1*) aşağı regülasyonunu araştırılmıştır. HCC'de *RAF1*'in tümörijenik rolü tartışmalı olduğundan, hücreSEL, moleküler ve fonksiyonel yaklaşımlar ve tavuk koryoallantoik membran (CAM) ksenograft modeli kullanarak *RAF1*:miR-4510 etkileşimleri de incelenmiştir (McGlynn et al.). Dokular hızlı dondurulmuş ve 80°C'de saklanmıştır. *RAF1* susturma, G0/G1 fazını hafifçe uzatarak ve S fazını kısaltarak Huh7 ve Hep3B hücrelerinin büyüme kapasitesini düşürdüğü gözlenmiştir. Beklendiği gibi, benzer ama daha güçlü etkiler miR-4510 ile gözlenmiştir (Ghousein et al., 2020). Bu çalışmada, *RAF1*'in HCC'de bir onkogen olarak davrandığını teyit edilmiştir ve ayrıca miR-4510'un *GPC3* ve *RAF1* dâhil olmak üzere aralarında *Wnt* ve *RAS/RAF/MEK/ERK* sinyal yollarında bulunan birçok proto-onkogeni hedeflediği bulunmuştur (Ghousein et al., 2020). MiR-4510'un HCC hücrelerinde *RAS/RAF/MEK/ERK* yolunu, 3'UTR'sinde bulunan bir bölge aracılığıyla doğrudan *RAF1*'i hedefleyerek inhibe ettiğini bulmuşlardır. HücreSEL düzeyde miR-4510, HCC hücre çoğalmasını ve göçünü inhibe ettiği ve kısmen *RAF1* mRNA'yı ve protein ekspresyonunu düşürerek yaşlanmayı indüklediği bulunmuştur. Son olarak, HCC hücrelerinde *RAF1* proteininin pro-tümöral işlevini ve in vitro ve in vivo olarak HCC tümör ilerlemesini sürdürme yeteneğini doğrulanmıştır (Ghousein et al., 2020).

Mir-4510, HCC hücrelerinde *GPC3*'ün en güçlü inhibitörüdür ve HCC hücre büyümesini ve proliferasyonunu inhibe ederek karaciğerde tümör baskılayıcı olarak görev yapmıştır (Cartier et al., 2017; Zynger et al., 2008) ki bu da HCC tümörlerinin küçülmesini sağlar. HCC'de mir-4510'un diğer moleküler hedefleri *GPC3* ve *RAF1*'dir ve daha sonra aralarında *Wnt* ve *RAS/RAF/MEK/ERK* sinyallerinin de bulunduğu temel biyolojik ve sinyal yollarını kontrol eder (Ghousein et al., 2020). Ayrıca, tümör baskılayıcı potansiyeli diğer kanser türlerinde de gösterilmiştir. MiR-4510'un aşağı regülasyonu, *APOC2* ekspresyonunu artırarak gastrointestinal stromal tümörlerin (GIST'ler) ilerlemesini teşvik edebilir (Chen et al., 2020).

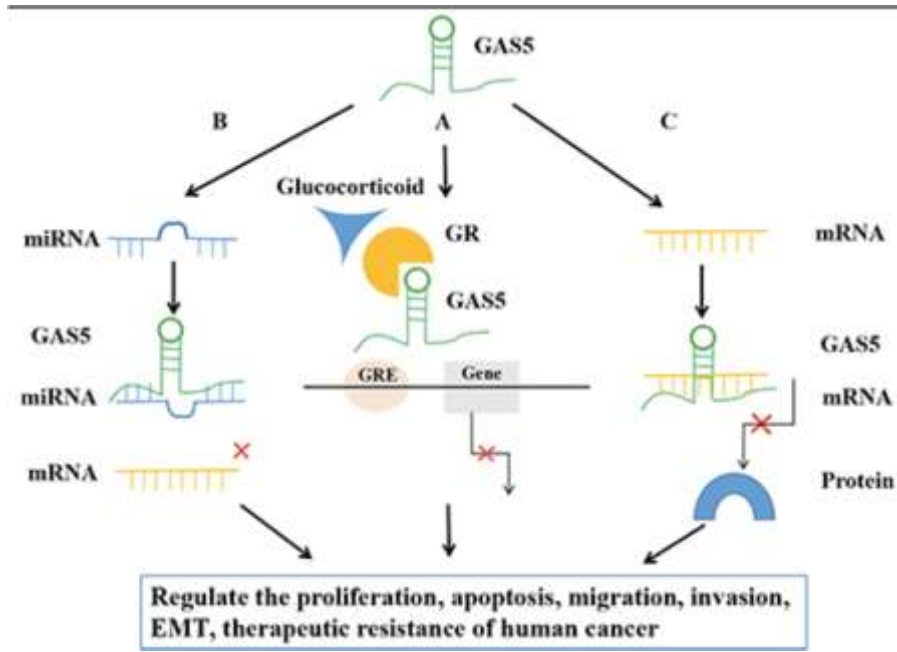
İlginç bir şekilde, miR-4510 ve sorafenib kombinasyonu, hücre apoptozunu indüklemeye tek başına miR-4510 veya sorafenibden daha etkili olduğu bulunmuştur ve sorafenib hem miR-4510 artışını hem de RAF1 protein azalmasını indüklediği bulunmuştur (Ghousein et al., 2020). Sonuç olarak, miR-4510 ile RAF1 susturma, miR-4510'un hepatik kanser hücreleri üzerindeki dikkate değer anti-tümöral etkisini kısmen açıklar (Cartier et al., 2017). Çünkü sorafenib veya regorafenib bazlı tedaviler iyileştirici değildir ve hastanın yaşam beklentisini sadece biraz artırır, alternatif terapötik çözümlere ihtiyaç duyan ilerlemiş aşamadaki HCC'li hastalar miR-4510 bazlı tedaviden yararlanabilir. Ek olarak, RAF1, MEK veya ERK inhibitörleri ile tedaviyi takiben nükseden hastalarda birçok direnç mekanizması deneyimlenmiştir, bu da multikinaz inhibitörlerini diğer anti-tümör ajan kategorileri ile aynı anda birden fazla onkojenik yolu bloke etme ihtiyacını vurgulamaktadır.

#### **4.4.3. lncRNA GAS5**

SNHG2 olarak da bilinen GAS5 1988 yılında tanımlanmıştır ve 1q25 lokusunda yerleşik sitoplazmik bir lncRNA'dır. Normal koşullarda çok kararsız olan GAS5, büyüme faktörlerinin eksikliğinden kaynaklanan hücrel stres varlığında, 5' ucunda bulunan oligoprimidin bölge sayesinde kararlı hale geçer. Bu bölge 1 sitozin ve ardından 5-15 adet pirimidin nükleotidinden oluşmaktadır. LncRNA GAS5'in bu bölgesi translasyonun kontrolünde görevlidir (Schneider et al., 1988)(Şekil 13). GAS5 besin bulamayan hücrelerde, glukokortikoid aktivitesini düzenleyerek hücreleri apoptoza duyarlı hale getirir (Kino et al., 2010). Fizyolojik koşullarda, glukokortikoid reseptörüne ligandı bağlandığında meydana gelen kompleks, DNA üzerindeki glukokortikoid cevap elementi (GRE)'ne bağlanarak apoptozun meydana gelmesinde görev alan genlerin baskılanmasına yol açar (Webster et al., 2002). Böylece, kaspaz 3,7 ve 9 apoptotik genlerinin baskılanmasına neden olur. GRE'ne yapısal benzerlik gösteren GAS5, glukokortikoid reseptörüne (GR) bağlanarak, reseptörün GRE ile etkileşime girmesini engeller (Wapinski & Chang, 2011) ve sonuç olarak cIAP ekspresyonu azalır ve kaspaz genleri üzerindeki baskılanma ortadan kalkar (Kino et al., 2010). Normal koşullarda çok kararsız olan GAS5, büyüme faktörlerinin eksikliğinden kaynaklanan hücrel stres varlığında, 5' ucunda bulunan oligoprimidin bölge sayesinde kararlı hale geçer. Bu bölge 1 sitozin ve ardından 5-15 adet pirimidin nükleotidinden oluşmaktadır. LncRNA GAS5'in bu bölgesi translasyonun kontrolünde görevlidir (Williams et al., 2011; Yu & Hann, 2019) (Şekil 14).



**Şekil 13.** lncRNA GAS5'in insan kromozomu üzerindeki ekzon bölgeleri



**Şekil 14.** lncRNA GAS5'in glukokortikoid reseptörü ile anahtar kilit modeli (Yu & Hann, 2019)

Yapılan çalışmalarda, GAS5'in kanser türleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Meme kanserinde GAS5'in ifade düzeylerinin, kanserden etkilenmemiş normal meme epiteliyle karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, melanoma, B-hücreli lenfoma, prostat ve meme kanserlerinde GAS5'in bulunduğu 1q25 lokusunda kromozomal translokasyonların meydana geldiği bilinmektedir. Sonuç olarak GAS5, apoptozu düzenlemekte ve insan hastalıklarının gelişmesinde potansiyel rol oynamaktadır (Mourtada-Maarabouni et al., 2008; Mourtada-Maarabouni et al., 2009). Tüm lncRNA türleri arasında, GAS5 tümör baskılayıcı lncRNA'lar arasında yükselen bir yıldızdır ve birçok kanserde GAS5 ekspresyonunun azaldığı gözlenmektedir (Ji et al., 2019).

Buna ek olarak, Tu ve arkadaşları ilk kez GAS5'in HCC hastalarının çoğunda ekspresyonunun azaldığını ve daha kötü prognozla ilişkili olduğunu kanıtlamıştır (Tu et al., 2014). Ayrıca miR-4510'un tümör baskılayıcı etkisi GPC3'ün azaltılmasının yanı sıra Wnt sinyalinin

inaktivasyonu ile de ilişkilidir (Cartier et al., 2017). Daha ziyade miR-4510, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalini yalnızca GPC3 aracılığıyla başlatma aşamasında değil, aynı zamanda LEF1 ve TCF7L1'i susturarak daha sonraki bir aşamada da etkisiz hale getirir (Monga, 2015). Ayrıca, GJA1, IRS1, PDGFRA ve SIX1 dahil olmak üzere Wnt/ $\beta$ -katenin yolağının kontrolü altındaki çeşitli onkogenik genlerin ekspresyonunu azaltır (Kong et al., 2014; Wei et al., 2014; Zhang et al., 2007). Bu nedenle, miR-4510 karaciğer dokularında çeşitli onkogenleri doğrudan ve dolaylı olarak inhibe eder ve karaciğerde önemli tümöral süreçleri antagonize eden ve sinyal kaskadlarını (örneğin Wnt yolu) inaktive eden önemli bir tümör baskılayıcı oluşturabilir. miR-4510, ileri karaciğer kanseri olan hastaların tedavisi için miRNA replasman tedavisi için bir aday olarak bulunmuştur (Cartier et al., 2017).

Birlikte ele alındığında, lncRNA GAS5 bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür ve potansiyel bir tedavi hedefi veya prognoz belirleyicisi olmayı vaat eder. GAS5'in aşağı regülasyonunun kesin mekanizması ve merkezi aşağı akış sinyal yolu daha fazla araştırmayı hak etmektedir.

Son zamanlarda, lncRNA'ların HCC'de önemli rollere sahip olduğu gösterilmiştir ve lncRNA-MVIH, lncRNA-H19, lncRNA-HEIH, lncRNA-HULC, lncRNA-TUC338 ve lncRNA-MEG3 dâhil olmak üzere birçok lncRNA, HCC ile ilişkilendirilmiştir (Braconi, Kogure, et al., 2011; Braconi, Valeri, et al., 2011; Lai et al., 2012; Matouk et al., 2007; Panzitt et al., 2007; Yang et al., 2011; Yuan et al., 2012).

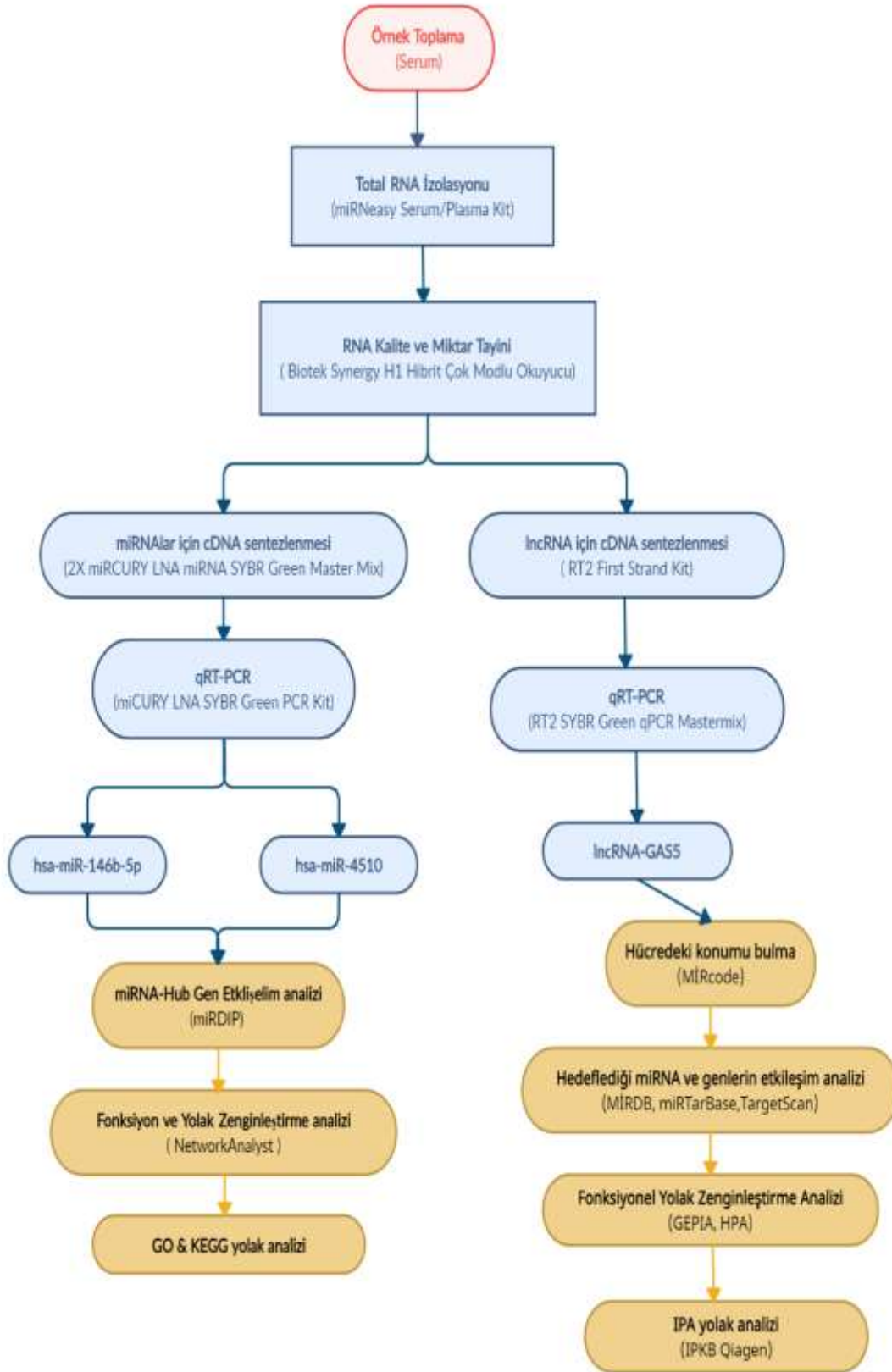
Belirli lncRNA'lar, tümör baskılayıcı genler olarak işlev görür. Kromozom 1q25'te bulunan GAS5 lncRNA, açlığa yanıt olarak apoptoz 2 (*cIAP2*) geninin hücrel inhibitörünü düzenleyen böyle bir tümör baskılayıcıdır ve prostat ve göğüs kanserlerinde ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (Pickard & Williams, 2014). lncRNA-GAS5'in, birçok kanserde ekspresyonunun azaldığı ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca lncRNA GAS5; Glukokortikoid reseptörüne bağlanır ve mTOR sinyallemesini modüle eder (Tu et al., 2014).

HCV enfeksiyonundan sonra artan ve viral replikasyonu azaltan az sayıda lncRNA tarif edilmiştir. lncRNA GAS5 buna mükemmel bir örnektir. GAS5, HCV enfeksiyonunda önemli bir antiviral rol oynar (Unfried & Fortes, 2020). HCV enfeksiyonu, HCV ile enfekte karaciğer hücrelerinde lncRNA GAS5 ve lncRNA HOTAIR'ı uyardığı gözlenmiştir (Li et al., 2016). lncRNA GAS5, lncRNA MEG3 ve lncRNA XIST gibi, daha kötü bir prognozla ilişkili bulunmuştur (Kim et al., 2020). lncRNA GAS5, HCC'de miR-21 ekspresyonunu azaltmak için miR-21'e doğrudan bağlanır (Z. Zhang et al., 2013). Karaciğer fibrozunda, GAS5 miR-222

ile etkileşime girer ve p27 proteininin ekspresyonunu artırır, böylece hepatosellüler kök hücrelerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe eder (Yu et al., 2015).

HCC'de lncRNA-GAS5 ekspresyon seviyesi, hastanın sağ kalımı ile ters orantılıdır (Chang et al., 2016; Slack & Chinnaiyan, 2019). LncRNA-GAS5 aşırı ekspresyonu proliferasyonu ve invazyonu inhibe eder ve lncRNA-GAS' in vimentin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Chang et al., 2016). LncRNA-GAS5, miR-126-3p ve miR-182 gibi bir dizi miRNA için bir sünger görevi görerek hedef genlerini modüle eder ve HepG2, HuH6 ve Hep3B hücrelerinin göçünü ve istilasını düzenler (Chen et al., 2019; Faranda et al., 2019).

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM



Şekil 15. İş akış şeması

## 5.1. Hastaların Serum Örneklerinin Toplanması

Serumlar, Marmara Üniversitesi Gastroenteroloji Enstitüsü HCC Biobankası'ndan (İstanbul, Türkiye) 18 yaş ve üzeri ve 15 serum HBV-HCC, 15 serum HBV-siroz, 16 serum KHB hastalarından ve 16 serum sağlıklı kontrollerden olacak şekilde toplandı. Hastaların klinik özellikleri tıbbi kayıtları incelenerek elde edildi. Siroz ve kronik hepatit B tanısı aynı zamanda uyumlu klinik öykü, serolojik belirteçler ve karaciğer biyopsi bulgularına dayanıyordu. Kontrol grubu üyelerinin hepatosellüler veya diğer kanserlere, karaciğer hastalığı geçmesine, hepatit B veya C enfeksiyonuna dair serolojik kanıtlara veya deney grubuyla herhangi bir ilişkiye dair hiçbir kanıtı yoktu. Her kontrol cinsiyete göre eşleştirildi. Katılımcının alımı, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 06.11.2020 tarihi 09.2020.1153 protokol kodu ile onaylandı. Tüm hasta ve kontrollere çalışmaya katılma konusunda bilgilendirilmiş onam verildi. Çalışma Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak gerçekleştirildi.

Çalışma, miRNA ekspresyon profili için 15 HBV-HCC, 15 HBV-siroz, 16 KHB hastası serumu ve 16 sağlıklı kontrol serumu ile gerçekleştirildi. LncRNA ekspresyon profili için de 12 HBV-HCC, 12 HBV-siroz ve 12 KHB hastası serumu ve 11 sağlıklı kontrol serum dahil edildi. İş akışı şekil 15'te gösterilmiştir.

Biyobankadan toplanan serum örnekleri 12.000 rpm'de 15 dakika boyunca 4°C'de santrifüjlendi, ardından serum süpernatantları dikkatli bir şekilde RNaz içermeyen tüplere aktarıldı ve ileri analizler için -80°C'de saklandı.

Biyobankadan alınan aligotlanmış serum örnekleri RNA çalışmaları için kullanılmak üzere;

1. Serumlar 1,5 ml'lik ependorflara alınarak 16,000 g'de 5 dakika +4°C'de yeniden santrifüj edildikten sonra üst faz izolasyon için kullanıldı.
2. Üst fazdan alınan serumlar 200 µl'lik alikotlar halinde ependorflara konarak ekspresyon tayini yapılacak güne kadar -80°C'de saklanmıştır.

## 5.2. Total RNA'ların Serumdan İzolasyonu

Toplam RNA, üreticinin protokolüne göre serum örneklerinden "miRNeasy Serum/Plazma Kiti" (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak izole edilmiştir.

1. Serum örneklerinin bazıları çözülmesi için 37°C su banyosunda inkübe edilmiştir.
2. Serumun 5 katı hacimde QIAzol Lysis Reagent eklenmiş, pipet ya da vortex ile karışması sağlanmıştır. (100µl serum + 500 µl QIAzol Lysis Reagent) QIAzol Lysis Reagent eklendikten sonra karışım -70°C'de birkaç ay saklanabilir.

3. Karışımı 5 dk inkübe edilmiştir.
4. 3,5 µl miRNeasy serum/plazma spike in control ( $1,6 \times 10^8$  kopya/ µl) eklenip karışması sağlanmıştır.

**Tablo 2.** MiRNeasy Serum/Plazma Kiti içindeki kimyasalların karışma oranları

Serum µl	QIAzol Lysis Reagent µl	Kloroform µl	Sıvı faz µl	%100 etanol µl
≤ 50	250	50	150	225
100	500	100	300	450
200	1000	200	600	900

5. Başlangıç serum miktarıyla eşit hacimde kloroform eklenmiştir. 15 sn. vortexlenmiş ve karışması sağlanmıştır (Tablo 2).
6. 2-3 dk. karışım oda ısısında inkübe edilmiştir.
7. 15 dk. 40C' de 12.000g' de santrifüj edilmiştir. (Isıtıcının sıcaklığı oda ısısına tekrar çevrilmelidir.) (Santrifüjden sonra 3 faz oluşur. Renksiz, üst sıvı faz RNA içerir, ara beyaz faz ve kırmızı, organik alt faz.) (100 µl serumla başlanırsa 300 µl üst faz elde edilir.)
8. Üst fazı yeni koleksiyon tüpüne alındı. (Kutu dışı tüp). Ara fazı almamaya çalış. 1,5 hacim %100 etanol eklenip, pipetaj yapılmıştır. Bu aşamada santrifüjlenmemelidir. Etanolden sonra çökelme olabilir, bu etkilemez çalışmayı. (100 µl serum →300 µl sıvı faz →450 µl etanol)
9. Karışımdan çökeltiliyi almadan 700 µl örnek alıp RNeasy MinElute Spin Column' a eklenmiştir. (2 ml koleksiyon tüpü içindeki) Kapağı sıkıca kapatıp oda ısısında  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000$  rpm)' de 15 sn. santrifüjlenmiştir. Akan sıvıyı atıp aynı tüple işleme devam edilmiştir.
10. Örnekten kalanlarla 9. Adımı tekrarlanmıştır. Sıvıyı atıp aynı tüp ile devam edilmiştir.
11. 700 µl Buffer RWT'yi kolona ekleyip, kapağı sıkıca kapatılmıştır. Oda ısısında  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000$  rpm)' de 15 sn. santrifüjlenerek kolonun yıkanması sağlanmıştır. Sıvıyı atıp aynı tüp ile devam edilmiştir.
12. 500 µl Buffer RPE'yi kolona ekleyip, kapağı sıkıca kapatılmıştır. Oda ısısında  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000$  rpm)' de 15 sn. santrifüjlenerek kolonun yıkanması sağlanmıştır. Sıvıyı atıp aynı tüp ile devam edilmiştir.
13. 500 µl %80'lik etanolü (37°C olmalı) kolona ekleyip kapağı sıkıca kapatılmıştır. Oda ısısında  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000$  rpm)' de 15 sn. santrifüjlenerek kolonun membranlarının yıkanması sağlanmıştır. (%80'lik etanol %96-100'lük etanol + RNase içermeyen su ile hazırlanmalı). (Kolonu tüpten ayırdığında kolonun sıvıya değmemiş olması gerekir.) Alt kısım tümüyle atılmıştır.

14. Kolonu yeni 2 ml'lik koleksiyon tüpüne alıp (kutudan), kolonun kapağını açıp son hızda (full speed), 5 dk. santrifüjlenmiş ve membranın kurutulması sağlanmıştır.
15. Kolonu yeni 1,5 ml'lik koleksiyon tüplerine koy. 14 µl RNase-free su direkt kolonun merkezine eklenip, kapağı kapalı şekilde full speed, 1 dk. santrifüjlenmiş ve RNA elüte edilmiş olur. (En az 10 µl su eklenmeli eğer konsantrasyonu yüksek tutmak istiyorsak ama bu durumda verim %20 azalır. 10 µl'nin altında kolon tam olarak hidrat olmuyor. Kolon 2 µl hacim aldığından elimizde 12 µl elüte kalır.
16. Saflaştırılmış RNA -20°C ile -70°Cde RNase free su içerisinde 1 yıla kadar saklanabilirler.

### 5.3. İzole Edilen Rnaların Düzeyinin Belirlenmesi

Ekspresyon tayini için bireylerden izole edilen miRNA ve lncRNA düzeylerinin başlangıç miktarlarının eşit olması gerekmektedir. Bu nedenle izole edilen RNA'ların miktar tayinleri 260 ila 320 nm'deki absorpsiyona dayalı olarak spektrofotometrik olarak BioTek Synergy H1 Hibrit Çok Modlu Okuyucu ile yapılmıştır. Veri toplama ve analizi için cihazın bağlı olduğu bilgisayarda Gen5 yazılımı kullanılmıştır. Daha sonra RNA, yeniden kullanılmak üzere -80 °C'lik bir buzdolabında saklandı.

### 5.4. MiRNAlar için cDNA Eldesi

Mirnalar için cDNA sentezi, üreticinin talimatlarına göre miRCURY® LNA® miRNA SYBR® Green PCR kiti ile Applied Biosystem BioRad C1000 Touch Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit, olgun miRNA'lara poly-A kuyruğu takılması ve poli A kuyruğuna özgü poly-T primer ile cDNA sentezlenmesini sağlar. Optimizasyon deneyleri sonucu en yüksek verimin sağlandığı reaksiyon içeriği ve koşulları aşağıdaki gibidir. Reaksiyon toplam 10 µl hacimde gerçekleştirilmiş (Tablo 3), sentez 42°C sıcaklıkta, enzim durdurma ise 95°C sıcaklıkta gerçekleştirildikten sonra ürünler 4°C'ye soğutulmuştur (Tablo 4).

**Tablo 3.** MiRNA'lar için cDNA sentezinin reaksiyon içeriği

Bileşenler	Miktar
5X Mircury Buffer	2 µl
Nukleaz free su	5 µl
Enzim	1 µl
RNA	2 µl
<b>Total hacim</b>	<b>10 µl</b>

**Tablo 4.** MiRNA'lar için cDNA sentezinin reaksiyon aşamaları

<b>Aşama</b>	<b>Süre</b>	<b>Sıcaklık</b>
Reverse-transkripsiyon	60 dk	42°C
Reaksiyonun inaktivasyonu	5 dk	95°C
Depolama	∞	4°C

### 5.5. LncRNAlar için cDNA Eldesi;

LncRNAlar için cDNA sentezi, üreticinin talimatlarına göre RT2 First Strand Kit ile Applied Biosystem BioRad C1000 Touch Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RT2 First Strand Kiti reverse transkripsiyondan önce RNA örneğinde kalan kontaminasyonu uzaklaştırmak için tescilli genomik DNA eliminasyon adımı içerir, böylece yanlış pozitif sinyallerin eliminasyona edilir. Ek olarak yapay bir RNA kontrol örneği içerir ki böylece reverse transkripsiyonun verimliliği bütün örneklerde takip edilebilir ve RNaz kontaminasyonuna karşı görüntülenebilir.

#### Prosedür

1. RT2 first Strand Kit malzemelerini nazikçe santrifüjlendi (10-15 sn) ki içeriklerik tüplerin dibine inmesi sağlanmıştır.
2. Tablo 5'te yer alan içeriklere göre her RNA örneği için steril PCR tübüne genomik DNA eliminasyon mixi hazırlanmıştır.
3. Pipetaj ile nazikçe karışmasını sağlanmıştır. Örneksiz kontrol hazırlamak için RNA örneği yerine 10 µl nükleaz free su kullanılmıştır.

**Tablo 5.** Genomik DNA Eliminasyon mix

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
RNA	25 ng -5 µg
Buffer GE	2 µl
Nükleaz free su	Değişken
<b>Total hacim</b>	<b>10 µl</b>

3. DNA eliminasyon mixini 5 dk 42°C'de inkübe et ve ardından hemen en az 1 dk olmak üzere buz üzerine yerleştirilmiştir.
4. Tablo 6'ya göre reverse transkripsiyon mixini hazırlanmış. Reverse transkripsiyon kontrolünü hazırlamak için, RE3 Reverse Transkriptaz mix yerine 2 µl Nükleaz-free su kullanılmıştır.
5. Genomik DNA eliminasyon mix içeren her tüpe 10 µl reverse transkripsiyon mixi eklenip ve nazikçe pipetleme yaparak karıştırılmıştır.
6. 60 dk 37°C'de inkübe edilmiştir. Sonra hemen 5 dk 95°C'de inkübasyonla reaksiyonu durdurulmuştur.

**Tablo 6.** Reverse-Transkription Mix

<b>Bileşenler</b>	<b>1 reaksiyon için hacimler</b>	<b>6 reaksiyon için hacimler</b>	<b>24 reaksiyon için hacimler</b>
5x Buffer BC3	4 µl	24 µl	96 µl
Control P2	1 µl	6 µl	24 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl	12 µl	48 µl
Nuclease-Free Water	3 µl	18 µl	72 µl
<b>Total Volume</b>	<b>10 µl</b>	<b>60 µl</b>	<b>240 µl</b>

7. Karışımı buzun üzerine al ve her tüpe 91 µl Nükleaz free su eklenmiştir. Birkaç sefer pipetleme ile karıştırılmıştır.

8. Real-time PCR protokolüne göre işleme devam edilmiştir.

Eğer Real-time PCR öncesinde karışımı saklamak istenirse, -20°C’de dondurulmuştur.

**Tablo 7.** MiRNA’lar için cDNA sentezinin reaksiyon aşamaları

<u>Aşama</u>	<u>Süre</u>	<u>Sıcaklık</u>
Reverse-transkripsiyon	60 dk	37°C
Reaksiyonun inaktivasyonu	5 dk	95°C
Depolama	∞	4°C

### 5.6. MiRNAlar için Real Time PCR ile Relatif Kantifikasyon

Real-Time PCR reaksiyonu DNA bağlayan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı olarak takibine olanak sağlar. SYBR Green bu amaçla sıklıkla kullanılan boyalardan biridir. Çift iplikli DNA molekulüne bağlanarak floresan ışığa verir. SYBR Green boyasından alınan ışımının sınır değeri aştığı noktaya Ct ya da Cp değeri adı verilmektedir (Şekil 16 ve 17). Bu noktada DNA amplifiye olmuş ve DNA’ya bağlanan boyanın verdiği ışığa sınır değeri aşmıştır. Elde edilen Ct değerleri relatif kantifikasyon için kullanılmıştır. İzolasyon esnasında ilave edilen sentetik miRNA kantifikasyonu ile elde edilen Ct değeri ile RNA pürifikasyon ve amplifikasyon verimliliği kontrol edilerek örnekler arası normalizasyon sağlanmıştır. Sentetik miRNA internal pozitif kontrol olarak görev yapacaktır. Elde edilen Ct değerleri internal kontrol ile normalize edildikten sonra relatif kantifikasyon için kullanılmıştır. Örneklerin Ekspresyon sonuçları  $\Delta\Delta CT$  metoduna göre tayin edilmiştir. Her bireyde miRNA için elde edilen Ct değerleri o bireydeki kontrol genlere ait Ct değerleri ile normalize edilmiştir.

Serumdaki miR-4510 ve miR-146b-5p ekspresyon seviyesi tayini için, elde edilen cDNA’dan miRNA spesifik LNA primerler ile hedef miRNA’lar miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kiti kullanılarak amplifiye edilmiştir. cDNA örnekleri 1:3, 1:5, 1:10, 1:15 ve 1:30 dilue edilerek denemeler yapılmış ve 1:30 dilüsyon ile devam edilmesine karar verilmiştir. Amplifikasyon

takibi için SYBR Green boyası kullanılmıştır. Bu kit içinde üniversal reverse primer bulunmaktadır. Her bir hedef miRNA'ya spesifik primer assay kullanılmıştır. Her bir örnekte 2 hedef miRNA ve 1 kontrol gen ekspresyonu LightCycler480 II Dizi Tespit Sistemi (Roche, Basel, İsviçre) kullanılarak tüm analizler 96 oyuklu plakalarda Real-time PCR ile tayin edilmiştir. Tüm RT-PCR deneyleri iki kopya halinde gerçekleştirildi ve miRNA ekspresyon analizi için housekeeping geni olarak SNORA66 kullanıldı. Tüm adımlar üreticinin önerdiği protokolü takip etti. Rölatif miR-4510 ve miR-146b-5p ekspresyonu, karşılaştırmalı döngü eşiği (Ct) yöntemi kullanılarak hesaplandı. Serumdaki miRNA'ları ölçmek için  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi kullanıldı. Aşağıdaki denkleme göre:  $\Delta Ct = Ct \text{ referansı} - Ct \text{ hedefi}$ . İfade analizi için  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi kullanıldı.

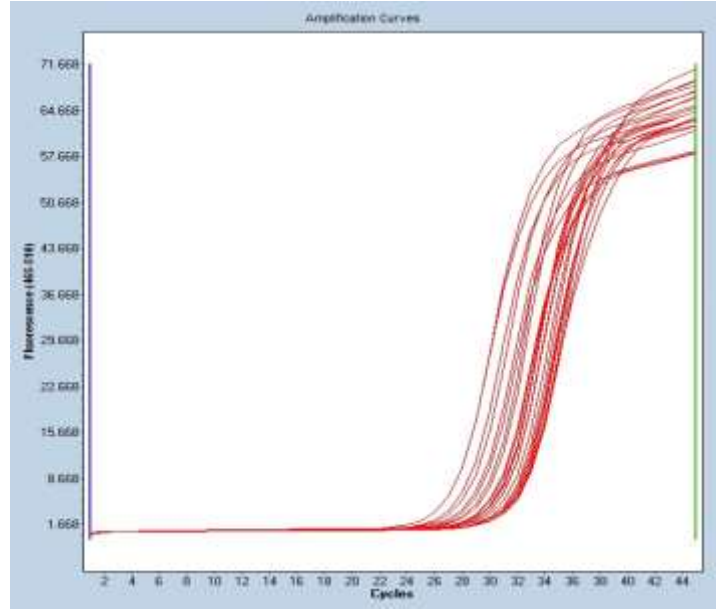
Optimizasyon denemeleri sonucunda elde edilen koşullar ve reaksiyon içeriği aşağıdaki gibidir. Reaksiyon toplam 10µl hacimde gerçekleştirilmiştir. 45 döngü boyunca amplifikasyon yapıp ışığa alınmıştır. Amplifikasyon sonrasında 60-95°C aralığında devamlı ışığa alınarak erime eğrisi elde edilmiştir.

**Tablo 8.** miRNA'lar için RT-PCR reaksiyon içeriği

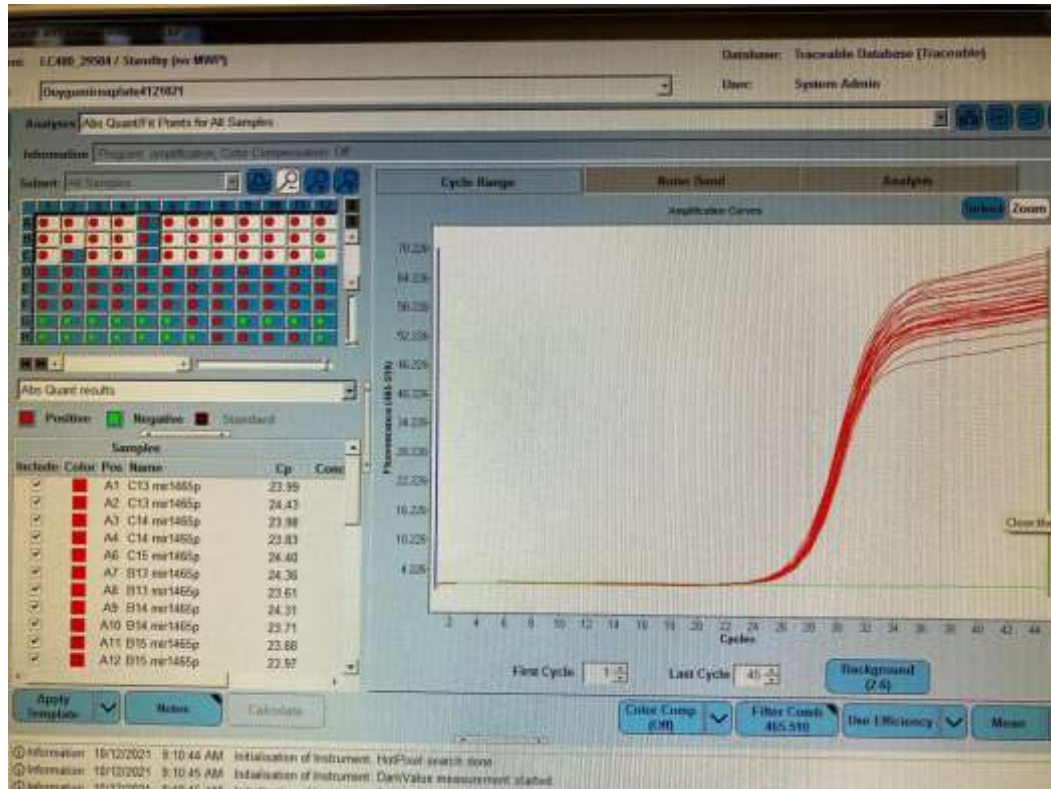
Bileşenler	Miktar
2X Mircury SYBR Green	5 µl
Primer Assay	1 µl
cDNA	3 µl (1/30 dilüe)
Nukleaz free su	1 µl
<b>Total hacim</b>	<b>10 µl</b>

**Tablo 9.** MiRNA'lar için RT-PCR aşamaları

Reaksiyon Aşama	Süre	Sıcaklık	Ramp Rate	Döngü	Ekler
PCR başlangıç sıcaklık aktivasyonu	2 dk	95°C		1	
Denatürasyon	10 sn	95°C	Maximal/fastmode		
Bağlanma ve Uzama	60 sn	56°C		45	SYBR Green Floresan datası toplanır.
Erime Eğrisi analizi		60-95°C			



Şekil 16. Amplifikasyon eğrisi, SYBR Green boyasından alınan ışımının sınır değeri aştığı noktaya Ct ya da Cp değerini oluşturur.



Şekil 17. MiR-146b-5p RT-PCR amplifikasyon eğrisi.

### 5.7. LncRNalar için Real Time PCR ile Relatif Kantifikasyon

First Strand Kit ile elde edilen cDNA' lardan spesifik primer assayler kullanılmıştır. Spesifik RT<sup>2</sup> lncRNA qPCR Assay for Human kitleri lncRNA' ların SYBR® Green tabanlı, gerçek zamanlı PCR tespiti için tasarlanmıştır. Bu kit aynı zamanda spesifik primer karışımını içeriyor. Real-Time PCR için cDNA, RT2 SYBR Green qPCR Mastermix ile amplifiye edilmiştir. Hedef

lncRNA' lara spesifik RT2 lncRNA qPCR Assay primer assay kullanılmıştır. Ayrıca lncRNA GAS5 ekspresyonunun normalizasyonu için kontrol geni olarak Beta-Aktin (ACTB) geni kullanılmıştır. Elde edilen cDNA' lar relatif kantifikasyon için uygun oranlarda yoğunluk ayarlaması yapılarak Real-time PCR reaksiyon karışımına eklenerek Light Cycler 480 Real time PCR aletinde kitin talimatnamesine göre amplifiye edilmiştir (Tablo 11). Örneklerin ekspresyon sonuçları  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metoduna göre tayin edilmiştir. Her bireyde lncRNA GAS5 için elde edilen Ct değerleri o bireydeki kontrol genlere ait Ct değerleri ile normalize edilmiştir. Kontrol ve hastalar arasındaki gen ekspresyonundaki farklılıkları gözlemlenmiştir.

#### Prosedür

1. RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix, RT<sup>2</sup> lncRNA qPCR Assay ve cDNA sentez karışımını kısaca (10-15sn) içerikleri tüpün dibinde toplamak için santrifüjlenmiştir.

Not: RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix sadece sıcakta aktive olan HotStart DNA Taq Polimeraz içeriyorsa, reaksiyon oda sıcaklığında hazırlanmalıdır. (15-25 °C)

1. PCR bileşenlerini nükleaz free tüpte Tablo 10'te tanımlandığı gibi hazırlanmıştır.

**Tablo 10.** lncRNA' lar için bir reaksiyon için PCR bileşenleri

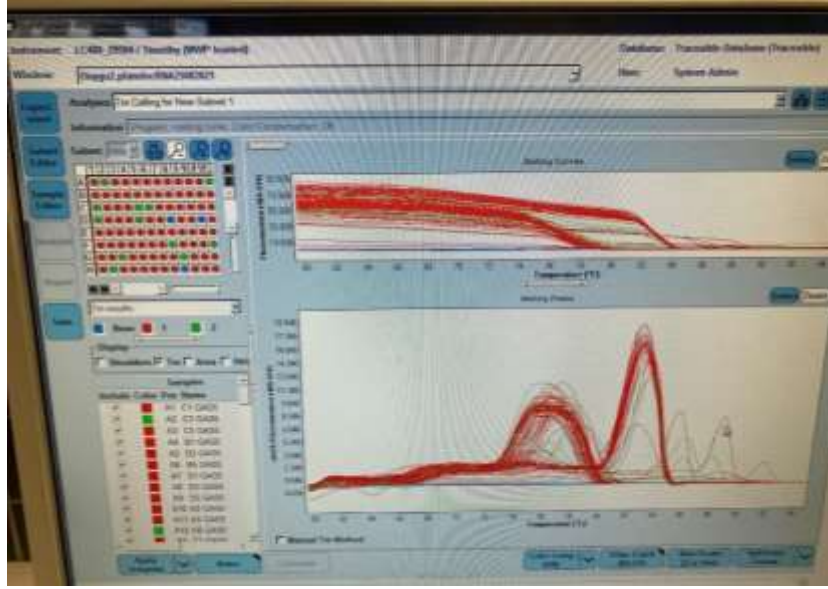
Bileşenler	Bir reaksiyon için hacimler
Nükleaz free su	10,5 µl
RT2 SYBR Green Mastermix	12,5 µl
cDNA	1 µl
RT2 lncRNA qPCR Assay (10µM stock)	1 µl
<b>Total Volume</b>	<b>25 µl</b>

3. Real-time PCR cihazına yerleştirmeden önce karışımın plate in dibine toplanması için balonları ve köpükleri önlemek için 1 dk 1000xg de santrifüjlenmiştir.

4. Real-time Cycler cihazınının programını Tablo 10'ye göre hazırlanmıştır.

**Tablo 11.** lncRNA' lar için RT-PCR aşamaları

Reaksiyon Aşama	Süre	Sıcaklık	Ramp Rate	Döngü	Ekler
PCR başlangıç sıcaklık aktivasyonu	10 dk	95°C		1	
Denatürasyon	15 sn	95°C			
Bağlanma ve Uzama	60 sn	56°C	1,5°C/sn.	45	SYBR Green Floresan datası toplanır.
Erime Eğrisi analizi		60-95°C			



**Şekil 18.** LncRNA GAS5 ve LncRNA ACTB için RT-PCR erime eğrisi.

Erime eğrisi, RT-PCR sonucu elde edilen ürünün doğru ürün olup olmadığının anlaşılmasını sağlar. Çift iplikli bir DNA molekülünün Tm değeri molekülün %50'sinin denatüre olabilmesi için gerekli sıcaklık değeridir. Molekülün uzunluğuna ve baz içeriğine bağlıdır. Bir primer ile elde edilen eş ampliconlar aynı ya da çok benzer Tm değerine sahip olmalıdır.

Işımanın sınır değeri aştığı anda amplifikasyondan emin olunur ancak doğru ampliconun takibinin yapıldığının belirlenebilmesi için erime eğrisinin incelenmesi gerekmektedir, SYBR Green belirli bir DNA moleküle bağlanan spesifik bir boya değil, tüm çift iplikli DNA moleküllerine bağlanan bir boyadır. Çift iplikli bir DNA molekülünün erime sıcaklığı yani molekülün %50'sinin denatüre olabilmesi için gerekli sıcaklık değeri molekülün uzunluğuna ve baz içeriğine bağlıdır. Dolayısıyla belli bir primer kullanılarak amplifiye edilmiş dizilerin belirli bir erime sıcaklığı olacaktır. RT-PCR ile amplifiye edilen DNA moleküllerinin erime sıcaklıkları cihaz tarafından görüntülenebilmektedir. Bütün ampliconlar için benzer ısı aralığında pik alınması PCR reaksiyonunun özgüllüğünün ispatıdır. Aynı sıcaklık değerinde pik veren örneklerde hedef dizi amplifiye olmuştur, elde edilen sinyal bir kontaminasyon ya da özgün olmayan bağlanmanın sonucu değildir (Şekil 18).

Deneylerde kullanılan LNA primerler oldukça spesifik olmasına rağmen elde edilen ürünlerin erime eğrileri incelenmiş, non-spesifik bağlanma sonucu yanlış amplicon veren örneklerin deneyleri tekrar edilmiştir. RT-PCR reaksiyonu ile kantitasyon yapılmasına yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan sıklıkla kullanılanı rölatif kantitasyon yöntemidir. Yöntem kabaca, belirli şartlar altında ekspresyonu değişmeyen, her doku ya da hücrede bazal düzeyde

ve hücreler arası varyasyon göstermeden eksprese edilen bir “house-keeping” gen ekspresyonunun hedef gen ekspresyonu ile kıyaslanmasına dayanır. Bu yönteme “delta delta Ct” adı verilmektedir. Bu yöntem, hedef DNA molekülü ve standart olarak kullanılan DNA molekülünün aynı verimlilik ile amplifiye olduğunu kabul ederek aşağıdaki formülasyona dayalı kantitasyon yapar.

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

Formülde geçen oran; hedef gen ekspresyonunun kontrole oranı, E; verimlilik,  $\Delta C_p$  ise Ct değerleri farkını ifade etmektedir. Hedef gen ve kontrol geninin PCR verimlilikleri birbirine ve 2’ye eşit kabul edildiğinde yeni formülasyon aşağıdaki gibi olacaktır.

$$\text{Oran} = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

$2^{-\Delta\Delta C_t}$  = Kontrole göre kat olarak ekspresyon değişimini ifade etmektedir. Pfaffl tarafından geliştirilen bu formülasyon günümüzde rölatif kantitasyon için kullanılmaktadır (Pfaffl, 2001). Kantitasyon ve analiz LightCycler 480 yazılımı ve delta delta Ct yöntemi kullanılarak yapılmıştır. MiRNA ekspresyonları SNORA66 ve lncRNA ekspresyonları Beta-Aktin genin ekspresyonuna göre normalize edilmiştir.

### 5.8. HCC’deki miRNA’ların in-siliko Ekspresyon Profili

DNA ve RNA dizileme teknolojisindeki ve ileri proteomik teknolojideki son gelişmeler, kanser araştırmalarını geliştirmiş ve hasta tedavisini kolaylaştırmıştır. Bu teknolojiler aynı zamanda çeşitli analizler gerçekleştirmek ve yeni biyobelirteçleri ve terapötik hedefleri belirlemek için potansiyel olarak kullanılacak kapsamlı veriler de üretir. Ancak büyük veri toplama, yönetim, iyileştirme, analiz ve paylaşma hâlâ bir darboğaz olmaya devam ediyor. Kanser biyologları ve araştırmacılarının biyobelirteçleri ve kanserle ilişkili biyolojik ilişkileri tanımlamaları, terapötik hedefleri keşfetmeleri ve mevcut ilaçları yeniden kullanmaları gerekiyor. Kanser Genomu Atlası Karaciğer Hepatoselüler Karsinom Koleksiyonu (TCGA-LIHC) örneklerinde ve normal örneklerde MiRNA ifadesi, miR-TV veri tabanı kullanılarak

analiz edildi (Pan & Lin, 2020). Box-Whisker Plot (Kutu-Bıyık Grafiği) ile normal ve tümör numunelerinde gen ekspresyon seviyesini gösterilmiştir. Eşit olmayan varyans dikkate alınarak student t testiyle istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı değerlendirildi. MiR-4510 ve miR-146b-5p'nin ekspresyon farklılığına ve HCC tümörleri ile normal numuneler arasındaki ortak hedef genlerine ilişkin kutu grafikleri, TCGA-LIHC veri setine dayalı UALCAN veri tabanı ile analiz edildi (Chandrashekar et al., 2017; Chandrashekar et al., 2022).

### **5.9. Hedef Genlerin Veri Toplanması ve Tahmini**

Genleri hedefleyen miRNA'lar, miRCarta, miRPathDB, miRbase, miRNA Tissue Atlas, miRTarbase veritabanlarını kullanarak miRNA-gen etkileşimlerini veren miRTargetLink Human veritabanlarından (<https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2>) tahmin edildi ve alındı (Kern et al., 2021). Biyoinformatik ve evrimsel genomik yazılımı (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) kullanılarak miR-146b-5p ve miR-4510'u hedef alan ortak genleri tanımlamak için bir Venn diyagramı hazırlandı.

### **5.10. Hedef Gen Yolaklarının Zenginleştirilmesi ve miRNA'ların Ağ Tabanlı Analizi**

MIENTURNET (<http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet/>) web aracı, miRNA-hedef etkileşimlerini değerlendirmek ve ağ tabanlı analizler gerçekleştirmek için kullanıldı (Licursi et al., 2019). Ağ Analisti (<https://www.networkanalyst.ca/>), gen ekspresyonu profili oluşturmayı, biyolojik ağ analizini ve görsel araştırmayı destekleyen kapsamlı bir gen merkezli platformdur. Gen seti aşırı temsil analizi (ORA), hesaplamalı olarak tanımlanmış modüllerin biyolojik anlamını keşfetmenin bir yöntemidir. Imex interaktom, jenerik PPI aracılığıyla protein-protein etkileşiminin (PPI) analizi için seçildi. Fonksiyon zenginleştirme analizinde hipergeometrik teste göre  $p < 0,05$  olan Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) ve Gen Ontolojisi (GO) terimleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. GSEA'dan önemli ölçüde zenginleştirilmiş her gen seti bir düğüm olarak temsil edilir. Örtüşen genlere sahip gen setleri bir kenarla bağlanır (örtüşme katsayısı veya Jaccard indeksi kullanılarak hesaplanır). Ağ görselleştirmesi, benzer gen kümelerini bir arada gruplayarak GSEA sonuçlarının yorumlanmasını basitleştirir. Bu platform, daha önce açıklandığı gibi miRTargetLink Human'dan elde edilen miR-146b-5p ve miR-4510 insan hedef genlerinin genetik protein-protein etkileşim yolunu ve küresel zenginleştirme analizini gerçekleştirmek için kullanıldı (Xia et al., 2014).

Ek olarak, daha önce açıklandığı gibi miRTargetLink İnsan veri tabanından elde edilen miR-146b-5p ve miR-4510 insan hedef genlerinin genetik protein-protein etkileşim yolu ve global

zenginleştirme analizini gerçekleştirmek için Network Analyst kullanıldı. MiR-4510 ve miR-146b-5p'nin hedef genleri, Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) zenginleştirmesini gerçekleştirmek için Ağ analist platformunda çalıştırıldı. Sonuçlar p değerlerine göre gösterildi.

### **5.11. Sağkalım Analizi (Kaplan-Meier Grafiği (KMplot))**

Gen ifadesinin hastanın sağ kalımı üzerindeki etkisini gösteren Kaplan-Meier grafiği ile primer tümör dokusuna sahip 372 Karaciğer hepatoselüler karsinomundan oluşan TCGA-LIHC veri setinde miR-146b-5p ve miR-4510 prognostik değeri değerlendirildi (<http://ulacan.path.uab.edu>). Sağkalım etkisi önemi bir log-rank (log-sıra) testiyle ölçülür. Bunun önemini belirlemek için log-rank testlerinden P değerleri elde edildi.

Kaplan Meier Grafiği, meme, yumurtalık, akciğer ve mide kanseri dahil 21 tümör tipinden alınan 25 binden fazla örnekte 30 bin genin (mRNA, miRNA, protein) ekspresyonu ile sağkalım arasındaki korelasyonu değerlendirme kapasitesine sahiptir. Veritabanlarının kaynakları arasında GEO, EGA ve TCGA bulunmaktadır (Lánczky & Györffy, 2021).

### **5.12. İstatistiksel Analiz**

Mikro ve uzun kodlamayan RNA ekspresyonları incelendikten sonra gruplar arası istatistiksel analizler SPSS yazılımının kullanılarak yapılmıştır. Değerlerin normal dağılıma uygunluklarının analizi Shapiro-Wilk testi ile analiz edilmiştir. Normal dağılıma uygun olmayan değerler için non-parametrik testler kullanıldı, medyan ve IQR (interquartile range) kullanıldı, normal dağılım gösteren değerler için parametrik analiz yöntemleri kullanılıp ortalama standart sapma bakıldı. Kategorik verilerin sonuçları mutlak sayı ve yüzde olarak verilmiştir. HBV-HCC, HBV-Siroz, KBV ve kontrol grupları arasında sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında, verilerin anormal dağılıma uyması durumunda Kruskal Wallis testi kullanıldı. İkişerli grup arasında post-hoc analizi için Mann-Whittney U testi kullanıldı. Kategorik parametreleri karşılaştırmak için  $\chi^2$  testi ve Fisher's exact testi kullanılmıştır. Mir146b-5p ve lncRNA GAS5' in HBV varlığı ve ilerlemesi ile potansiyel ilişkini araştırmak için lojistik regresyon analizi kullanıldı. Mir-146b-5p ve lncRNA GAS5 arasındaki olası bir korelasyonu araştırmak için spearman rho testi yapıldı. Mir-146b-5p ve lncRNA GAS5' in HBV-HCC hastalarında sağkalım ile ilişkisini ortaya çıkarmak için tek değişkenli Cox-regresyon analizi yapıldı. İstatistiksel farkın anlamlılık düzeyinin değerlendirilmesinde  $p \leq 0,05$  sınır değeri kullanılmıştır. Tüm istatistiksel analizler SPSS yazılımının 20.0 sürümü (IBM, Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapıldı.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Grupların Özelliklerinin Belirlenmesi

Marmara Üniversitesi Gastroenteroloji Enstitüsü Biyobankasında bulunan 18 yaş ve üzeri yetişkin 15 Hepatit B virüsü (HBV) ile ilişkili HCC (HBV-HCC), 15 HBV ile ilişkili Siroz (HBV-Siroz), 16 Kronik Hepatit B hastaları (KHB) ve 16 sağlıklı kontrol birey çalışmaya dâhil edilmiştir. Gruplara ait bireylerin yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, diyabet hastası olup olmaması, sigara kullanıp kullanmaması, Child-Pugh skorları, MELD skorları, Asitleri, Özofagostik suları, Varsial kanama geçmişleri, Hepatik ensefalopati ve alfa-1 fetoprotein (AFP) miktarı ortalamaları (minimum değer-maksimum değer) şeklinde aşağıdaki tablo 12’de verilmiştir.

**Tablo 12.** Çalışmaya dahil edilen bireylerin verileri

	<b>HBV-HCC (n=15)</b>	<b>HBV-Siroz (n=15)</b>	<b>KHB (n=16)</b>	<b>Kontrol (n=16)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Yaş (Yıl)</b>	56 (30-76)	54 (31-77)	59 (30-70)	44(20-51)	<b>0.001</b>
<b>Cinsiyet</b>					
<b>Kadın</b>	9 (60.0)	8 (53.3)	7 (43.8)	9 (56.3)	0.660
<b>Erkek</b>	6 (40.0)	7 (46.7)	9 (56.2)	7 (43.8)	
<b>Vücut Kütle İndeksi (VKİ)</b>	26.7 (19.5-45.7)	30.1 (18.0-46.7)	30.1 (18.0-46.7)	-	0.587
<b>Diyabet</b>	4 (26.7)	2 (13.3)	3 (18.8)	-	0.651
<b>Sigara</b>	7 (46.7)	3 (20.0)	3 (18.8)	-	0.155
<b>Child-Pugh skoru</b>	7 (5-9)	5 (5-10)	-	-	<b>0.031</b>
<b>MELD skoru</b>	13 (7-19)	11 (7-14)	-	-	0.119
<b>Asitler</b>	9 (64.3)	4 (26.7)	-	-	0.066
<b>Özofagostik sular</b>	7 (50.0)	8 (53.3)	-	-	0.858
<b>Varsial kanama geçmişi</b>	0 (0.0)	2 (13.3)	-	-	0.483
<b>Hepatik Ensefalopati</b>	2 (14.3)	2 (13.3)	-	-	0.941
<b>AFP</b>	8.9 (1.1-230140.0)	1.8 (0.8-4.3)	-	-	<b>0.003*</b>

Buna göre bütün grupların yaş ortalaması karşılaştırıldığında güçlü bir ilişki bulunmuştur ( $P<0,001$ ). HBV-HCC, HBV-Siroz ve KHB gruplarının yaş ortalaması ile ilişki bulunamamıştır ( $P=0.905$ ) Ayrıca KHB ve HBV-Siroz grubu karşılaştırıldığında değer  $P=0,770$  bulunmuş, HBV-Siroz ve HBV-HCC grupları karşılaştırıldığında  $p=0,775$  olarak bulunmuş, aralarında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. HBV-Siroz ve HBV-HCC grupları Child-Pugh skorları ve AFP miktarı açısından karşılaştırıldığında P değerleri sırasıyla  $P=0,031$  ve  $p=0,003$  olarak bulundu. Diğer belirteçler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ( $P>0,05$ ).

Gruplar arasında ayırıcı tanıda kullanılacak diğer belirteçler arasından sadece AFP miktarı açısından HBV-Siroz ve HBV-HCC grupları karşılaştırıldığında  $p=0,003$  olarak bulunmuş, aralarında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Diğer belirteçler ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).

## **6.2. İzole Edilen RNA'ların Miktarının Belirlenmesi**

Ekspresyon tayini için bireylerden izole edilen miRNA ve lncRNA düzeylerinin başlangıç miktarlarının eşit olması gerekmektedir. Bu nedenle izole edilen toplam RNA'ların miktar tayinleri BioTek Synergy H1 Hibrit Çok Modlu Okuyucu ile yapılmıştır. Veri toplama ve analizi için cihazın bağlı olduğu bilgisayarda Gen5 yazılımı kullanılmıştır. Buna göre RNA miktarları Tablo 13'teki gibi bulunmuştur.

**Tablo 13.** Örneklerin RNA konsantrasyonlarının ölçüm sonuçları

Örnek No	RNA konsantrasyonu $\mu\text{g/ml}$	Örnek No	RNA konsantrasyonu $\mu\text{g/ml}$
HBV-HCC1	21,888 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz1	23,545 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC2	21,521 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz2	20,841 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC3	17,031 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz3	27,480 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC4	9,716 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz4	10,641 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC5	18,326 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz5	21,732 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC6	11,908 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz6	30,281 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC7	28,475 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz7	30,545 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC8	14,852 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz8	30,182 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC9	28,119 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz9	1,418 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC10	20,923 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz10	1,578 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC11	28,865 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz11	1,002 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC12	66,962 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz12	1,328 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC13	30,266 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz13	39,888 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC14	16,316 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz14	25,531 ng/ $\mu\text{l}$
HBV-HCC15	41,141 ng/ $\mu\text{l}$	HBV-Siroz15	32,021 ng/ $\mu\text{l}$
KHB1	14,873 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol1	24,898 ng/ $\mu\text{l}$
KHB2	21,188 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol2	34,086 ng/ $\mu\text{l}$
KHB3	16,621 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol3	12,561 ng/ $\mu\text{l}$
KHB4	19,004 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol4	14,440 ng/ $\mu\text{l}$
KHB5	10,834 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol5	18,691 ng/ $\mu\text{l}$
KHB6	43,671 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol6	23,994 ng/ $\mu\text{l}$
KHB7	24,680 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol7	31,034 ng/ $\mu\text{l}$
KHB8	10,693 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol8	20,272 ng/ $\mu\text{l}$
KHB9	10,483 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol9	23,030 ng/ $\mu\text{l}$
KHB10	49,196 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol10	21,208 ng/ $\mu\text{l}$
KHB11	40,294 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol11	18,167 ng/ $\mu\text{l}$
KHB12	20,229 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol12	19,362 ng/ $\mu\text{l}$
KHB13	18,375 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol13	22,378 ng/ $\mu\text{l}$
KHB14	39,839 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol14	38,828 ng/ $\mu\text{l}$
KHB15	42,420 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol15	20,639 ng/ $\mu\text{l}$
KHB16	16,110 ng/ $\mu\text{l}$	Kontrol16	19,592 ng/ $\mu\text{l}$

### 6.3. Real-Time PCR ile Relatif Kantitasyon Sonuçları

Real-Time PCR deneyleri sonucu elde edilen ortalama Ct değerleri Tablo 14’de listelenmiştir. Bu değerler rölatif kantitasyonda kullanılacak olup, tüm reaksiyonlar duplike yapılmış ve hesaplama aşamasında elde edilen 2 değerın ortalaması alınmıştır. Ct değeri belirtilmemiş örneklerde amplifikasyon olmamıştır. Tüm  $\Delta\text{Ct}$  değerleri miRNAlar için SNORA66 ve lncRNA GAS5 için Beta-Aktin house keeping genleri kullanılarak grupların kantitatif ekspresyon değerleri ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  değerleri) hesaplanmıştır. Buna göre en yüksek ekspresyon düzeyi kontrol grubunda, en düşük ekspresyon düzeyi ise HCC grubunda gözlemlendi.

**Tablo 14.** Ekspresyon deneylerinde elde edilen ortalama Ct değerleri

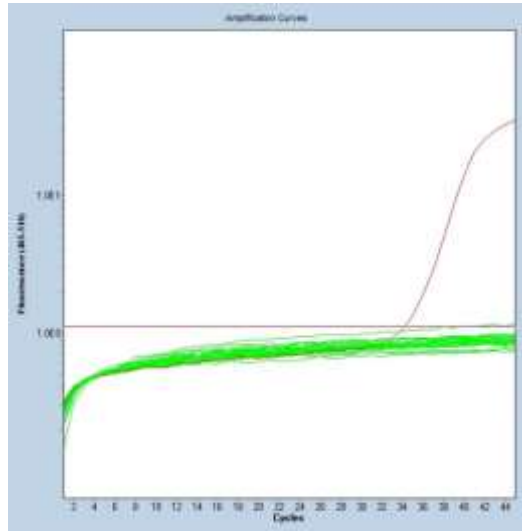
Örnek	Ct değerleri				
	miR-4510	miR-146b-5p	SNORA66	LncRNA-GAS5	lncRNA-ACBT
HBV-HCC1	0,00	27,87	31,84	30,00	30,92
HBV-HCC2	0,00	27,94	30,26	30,17	30,67
HBV-HCC3	0,00	27,60	29,69	29,77	30,41
HBV-HCC4	0,00	25,93	30,55	30,43	29,71
HBV-HCC5	0,00	24,81	27,73	29,07	30,97
HBV-HCC6	0,00	25,42	27,24	31,73	27,57
HBV-HCC7	0,00	25,23	27,22	38,98	36,20
HBV-HCC8	0,00	25,42	28,73	37,09	36,17
HBV-HCC9	0,00	26,39	27,97	36,06	34,22
HBV-HCC10	0,00	25,37	27,46	34,14	36,03
HBV-HCC11	0,00	25,35	28,22	33,22	34,83
HBV-HCC12	0,00	24,32	28,10	30,38	30,54
HBV-HCC13	0,00	24,21	28,19		
HBV-HCC14	0,00	23,91	27,15		
HBV-HCC15	0,00	23,41	27,77		
<b>HBV-HCC Ortalama</b>	<b>0,00</b>	<b>25,54</b>	<b>28,54</b>	<b>32,58</b>	<b>32,35</b>
HBV-Siroz1	0,00	27,29	30,69	29,39	31,935
HBV-Siroz2	0,00	24,00	30,39	29,595	29,595
HBV-Siroz3	0,00	27,38	31,83	30,005	30,845
HBV-Siroz4	0,00	26,73	29,58	29,245	29,225
HBV-Siroz5	0,00	24,44	28,76	30,015	31,185
HBV-Siroz6	0,00	26,25	28,90	29,41	30,395
HBV-Siroz7	0,00	24,41	27,60	31,37	34,395
HBV-Siroz8	0,00	23,84	28,00	31,515	31,36
HBV-Siroz9	0,00	21,78	28,43	32,225	33,115
HBV-Siroz10	0,00	23,40	28,44	36,165	34,665
HBV-Siroz11	0,00	22,54	28,41	31,885	34,475
HBV-Siroz12	0,00	22,95	28,94	31,5	34,605
HBV-Siroz13	0,00	24,32	27,73		
HBV-Siroz14	0,00	23,67	27,75		
HBV-Siroz15	0,00	23,80	27,63		
<b>KHB-Siroz Ortalama</b>	<b>0,00</b>	<b>24,45</b>	<b>28,87</b>	<b>31,02</b>	<b>32,14</b>

**Tablo 14.** Ekspresyon deneylerinde elde edilen ortalama Ct değerleri (Devamı)

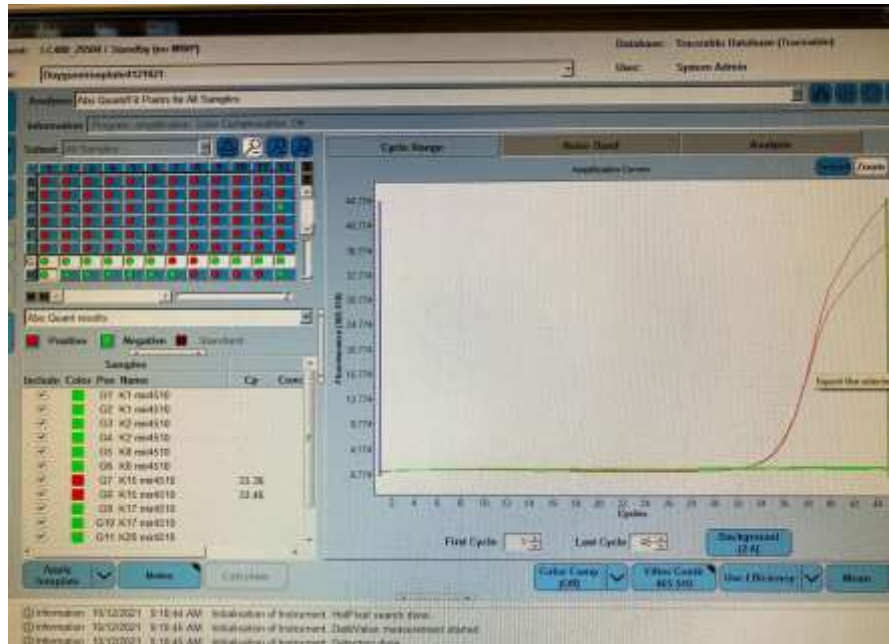
Örnek	Ct değerleri				
	miR-4510	miR-146b-5p	SNORA66	LncRNA-GAS5	lncRNA-ACBT
KHB1	0,00	26,04	32,46	29,33	29,07
KHB2	0,00	27,65	31,69	30,18	29,125
KHB3	0,00	26,28	30,215	29,68	29,885
KHB4	0,00	25,50	31,63	29,75	28,825
KHB5	0,00	22,26	27,9	29,805	30,125
KHB6	0,00	24,93	27,99	33,295	28,405
KHB7	0,00	25,82	27,84	37,525	35,85
KHB8	0,00	24,22	28,63	32,13	32,925
KHB9	0,00	23,57	27,855	36,485	33,225
KHB10	0,00	24,83	28,14	36,4	35,815
KHB11	0,00	23,79	27,805	37,645	32,91
KHB12	0,00	25,79	28,9	32,705	31,21
KHB13	0,00	23,99	28,06		
KHB14	0,00	24,01	28,005		
KHB15	0,00	23,93	27,605		
KHB16	0,00	24,13	27,77		
<b>KHB Ortalama</b>	<b>0,00</b>	<b>24,79</b>	<b>28,91</b>	<b>32,91</b>	<b>31,44</b>
Kontrol1	0,00	23,80	27,91	30,35	34,97
Kontrol2	0,00	23,72	28,12	30,67	35,76
Kontrol3	0,00	25,01	28,51	30,19	29,94
Kontrol4	0,00	24,28	28,12	30,63	34,70
Kontrol5	0,00	24,52	28,50	29,90	30,38
Kontrol6	0,00	23,17	27,59	30,35	34,97
Kontrol7	0,00	24,13	28,41		
Kontrol8	0,00	24,71	27,15		
Kontrol9	0,00	25,11	28,43	32,20	35,72
Kontrol10	0,00	22,45	28,20	31,23	33,69
Kontrol11	34,45	22,16	28,57	35,21	34,82
Kontrol12	0,00	22,52	28,37	37,71	34,85
Kontrol13	33,99	24,04	28,14	29,32	31,85
Kontrol14	0,00	23,50	32,25	34,36	36,76
Kontrol15	33,41	26,54	28,14		
Kontrol16	0,00	23,95	32,25		
<b>Kontrol Ortalama</b>	<b>7,275</b>	<b>23,97</b>	<b>28,23</b>	<b>31,98</b>	<b>33,95</b>
<b>K11, K13, K15 Ortalama</b>	<b>33,95</b>				

### 6.3.1. miR-4510 ekspresyon analizi

HBV-HCC, HBV-Siroz ve KHB gruplarında miR-4510 eksprese edilmemiştir. Sadece kontrol grubunda bulunan 3 bireyde ekspresyon görülmüştür. Bu üç bireyin miR-4510 ekspresyonu ortalama Ct değeri 33,95 olarak hesaplanmıştır. MiR-4510'un RT-PCR amplifikasyon eğrisinin noise bant oluşturduğu şekil 19 ve 20' de gösterilmiştir. Gruplar arasında karşılaştırılabilecek kantitatif bir değeri olmaması dolayısıyla istatistiksel olarak analizi yapılmamıştır. Sadece kontrol grubundan üç bireyde bulunması dolayısıyla kalitatif bir ölçüt olarak düşünülmüştür. Hepatit B virüsünün bulaşından sonra ekspresyonu azalmış ya da baskılanmış olabilir.



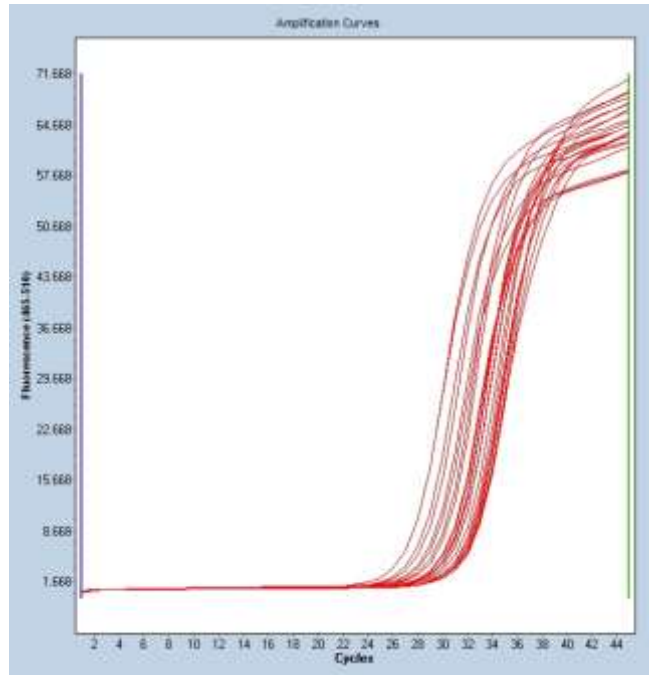
Şekil 19. 11 numaralı kontrol örneğine ait miR-4510 RT-PCR amplifikasyon eğrisi



Şekil 20. 13 ve 15 numaralı kontrol örneğine ait miR-4510 RT-PCR amplifikasyon eğrisi

### 6.3.2. MiR-146b-5p ekspresyon analizi

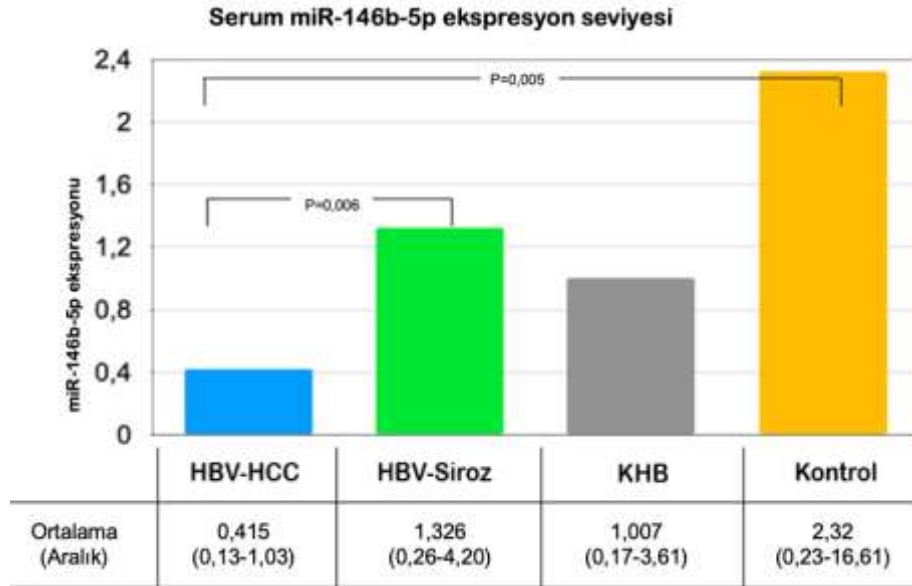
Bu çalışmanın amacı, serum miR-146b-5p ve miR-4510'un HCC için biyobelirteçler olarak potansiyel kullanımını araştırmaktır. Bu marker keşif aşamasında, tüm reaksiyonlar iki kopya halinde çalışıldı ve miR-146b-5p için  $\Delta Ct$  değerleri, housekeeping geni SNORA66 kullanılarak hesaplandı. Ekspresyonunun bütün gruplarda düzgün bir eğri verdiğini gösteren amplifikasyon eğri grafiği Şekil 21'de gösterilmiştir. Tüm grupların kantitatif ekspresyon değerleri Pfaffl tarafından geliştirilen formülasyon ile ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri) miR-146b-5p için sırasıyla Tablo 15'te gösterilmiştir.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  grupların kontrole göre kat olarak ekspresyon değişimini ifade etmektedir. Buna göre miR-146b-5p ekspresyonu en az HBV-HCC grubunda olmuştur, en çok da kontrol grubunda olmuştur. Bu veriler grafik olarak Şekil 22'de gösterilmiştir.



Şekil 21. mir-146b-5p RT-PCR amplifikasyon eğrisi

Tablo 15. miR-146b-5p için  $\Delta Ct$  değerleri tablosu

Grup	miR-146b-5p	SNORA66	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
HBV-HCC	25,54	28,54	-3,00	0,38
HBV-Siroz	24,45	28,87	-4,42	1,22
KHB	24,79	28,91	-4,11	0,93
Kontrol	23,97	28,66	-4,69	2,66



**Şekil 22.** Serum miR-146b-5p relatif ekspresyon seviyesi

Gruplardaki  $\Delta Ct$  değerlerinin normal dağılıma uygun olmadığı gözlemlendi. Bu sebeple gruplar arası fark parametrik olmayan (nonparametrik) yöntemlerden Kruskal Wallis testi ile incelendi. Mikro RNA 146b-5p için gruplar arasında güçlü bir ilişki saptandı ( $P=0,009$ ) (Tablo 16). Gruplar ikili şekilde karşılaştırıldığında HBV-HCC grubu ve HBV-Siroz grubu ile kontrol grubu arasında güçlü bir ilişki saptandı sırasıyla  $P=0,006$  ve  $P=0,005$  olarak bulundu. Diğer grup karşılaştırmalarında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu analizler Tablo 17’ de gösterilmiştir. Cinsiyete göre miR-146b-5p ekspresyonu ile hastalık oluşturma olasılığına bakıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 18). AFP miktarı ile miR-146b-5p’nin korelasyonuna baktığımızda değerler normal dağılım göstermediği için Spearman’ın sıralama korelasyon katsayısı (Spearman’s rho test) testi uygulanmıştır. Buna göre AFP ile miR-146b-5p ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Tablo 19).

**Tablo 16.** miR-146b-5p’ nin ekspresyonunun gruplarla istatistiksel ilişkisi

	<b>HBV-HCC0 (n=15)</b>	<b>HBV-Siroz (n=15)</b>	<b>KHB (n=16)</b>	<b>Kontrol (n=16)</b>	<b>P değeri</b>
<b>Mir-146b-5p</b>	7,568 (3,000-24,590)	17,876 (6,276-100,079)	16,055 (4,069-85,924)	18,317 (5,426-396,176)	<b>0,009*</b>

**Tablo 17.** miR-146b-5p’ nin ikili gruplar şeklinde istatistiksel analizi

	<b>Mean Rank Difference</b>	<b>P-değeri</b>
HBV-HCC ile HBV-Siroz	-18,233	<b>P=0,006</b>
HBV-HCC ile KHB	-14,719	P=0,059
HBV-HCC ile Kontrol	-19,357	<b>P=0,005</b>
HBV-Siroz ile KHB	3,515	0,476
HBV-Siroz ile Kontrol	-1,124	P=0,793
KHB ile Kontrol	-4,638	P=0,454

**Tablo 18.** Cinsiyete göre miR-146b-5p ekspresyonu ile hastalığın ilerleme olasılığı

		<b>Odds Ratio</b>	<b>95% Güven aralığı</b>	<b>P Değeri</b>
<b>Kadın</b>	<b>KHB (vs Kontrol)</b>	0,993	0,975-1,012	0,462
	<b>HBV-Siroz (vs KHB)</b>	0,979	0,941-1,020	0,313
	<b>HBV-HCC (vs HBV-Siroz)</b>	0,946	0,841-1,063	0,350
<b>Erkek</b>	<b>KHB (vs Kontrol)</b>	0,889	0,686-1,151	0,372
	<b>HBV-Siroz (vs KHB)</b>	1,105	0,965-1,266	0,149
	<b>HBV-HCC (vs HBV-Siroz)</b>	0,713	0,449-1,132	0,152

**Tablo 19.** AFP ile mir-146b-5p arasındaki korelasyon

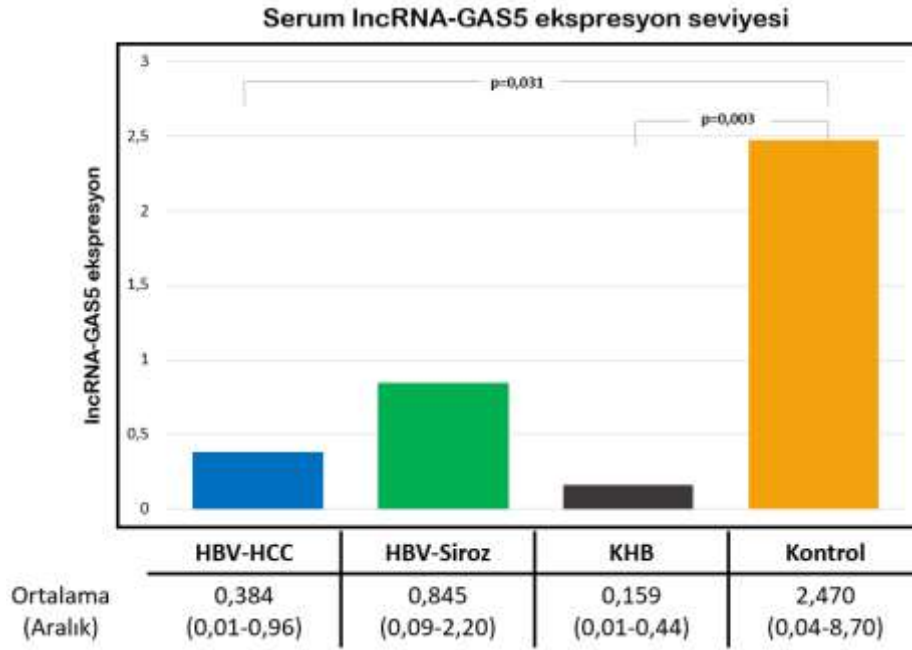
	<b>Spearman's rho</b>	<b>P-değeri</b>
<b>mir-146b-5p</b>	-0,233	0,225

### 6.3.3. lncRNA GAS5 ekspresyon analizi

Bu çalışmanın amacı, serum lncRNA GAS5'in HCC için biyobelirteçler olarak potansiyel kullanımını araştırmaktır. Tüm reaksiyonlar iki kopya halinde çalışıldı ve lncRNA GAS5 için  $\Delta Ct$  değerleri, internal kontrol geni ACTB kullanılarak hesaplandı. Pfaffl tarafından geliştirilen formülasyon ile lncRNA GAS5 için tüm grupların kantitatif ekspresyon değerleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri) Tablo 20'de gösterilmiştir.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  grupların kontrole göre kat olarak ekspresyon değişimini ifade etmektedir. Buna göre lncRNA GAS5 ekspresyonu en az KHB grubunda olmuştur, en çok da kontrol grubunda olmuştur. Bu veriler grafik olarak Şekil 23'de gösterilmiştir.

**Tablo 20.** lncRNA GAS5 için  $\Delta Ct$  değerleri tablosu

<b>Grup</b>	<b>lncRNA GAS5</b>	<b>ACTB</b>	<b><math>\Delta Ct</math></b>	<b><math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math></b>
<b>HBV-HCC</b>	32,58	32,35	0,23	0,38
<b>HBV-Siroz</b>	31,03	32,15	-1,12	0,85
<b>KHB</b>	32,91	31,45	1,46	0,16
<b>Kontrol</b>	31,98	33,95	-1,97	2,47



**Şekil 23.** lncRNA GAS5 gruplar arasındaki ekspresyon farkı

Gruplardaki  $\Delta Ct$  değerlerinin normal dağılıma uygun olmadığı gözlemlendi. Bu sebeple gruplar arası fark parametrik olmayan (nonparametrik) yöntemlerden Kruskal Wallis testi ile incelendi. Uzun kodlamayan RNA GAS5 için gruplar arasında güçlü bir ilişki saptandı ( $P=0,002$ ) (Tablo 21). Gruplar ikili şekilde karşılaştırıldığında HBV-HCC grubu ile kontrol grubu arasında ve KHB grubu ile kontrol grubu arasında güçlü bir ilişki saptandı sırasıyla  $P=0,031$  ve  $P=0,003$  olarak bulundu. Diğer grup karşılaştırmalarında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu analizler Tablo 22’de gösterilmiştir. Cinsiyete göre lncRNA GAS5 ekspresyonu ile hastalık oluşturma olasılığına bakıldığında farklılıklar bulunmuş olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 23). Alfa-1 fetoprotein (AFP) miktarı ile lncRNA GAS5’in korelasyonuna baktığımızda değerler normal dağılım göstermediği için Spearman’ın sıralama korelasyon katsayısı (Spearman’s rho test) testi uygulanmıştır. Buna göre AFP ile lncRNA GAS5 ekspresyonu arasında zayıf ve ters yönlü bir korelasyon olduğunu, yani bu iki değişken arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Tablo 24).

**Tablo 21.** lncRNA GAS5’ in ekspresyonunun gruplarla istatistiksel ilişkisi

	HBV-HCC (n=12)	HBV-Siroz (n=12)	KHB (n=12)	Kontrol (n=12)	P değeri
<b>lncRNA GAS5</b>	1,263 (0,055-3,745)	1,916 (0,353-8,603)	0,503 (0,033-1,735)	5,521 (0,137-34,059)	<b>0,002*</b>

**Tablo 22.** lncRNA GAS5'in ikili gruplar şeklinde istatistiksel analizi

	Mean Rank Difference	P değeri
HBV-HCC ile HBV-Siroz	-8,833	P=0,106
HBV-HCC ile KHB	8,167	P=0,059
HBV-HCC ile Kontrol	-11,557	<b>P=0,031</b>
HBV-Siroz ile KHB	17,000	P=0,094
HBV-Siroz ile Kontrol	-2,723	P=0,460
KHB ile Kontrol	-	<b>P=0,003</b>

**Tablo 23.** Cinsiyete göre lncRNA-GAS5 ekspresyonu ile hastalığın ilerleme olasılığı

		Odds Ratio	95% Confidence Interval	P değeri
Kadın	<b>KHB (vs Kontrol)</b>	0,423	0,132-1,359	0,149
	<b>HBV-Siroz (vs KHB)</b>	52,067	0,338-6988,004	0,114
	<b>HBV-HCC (vs HBV-Siroz)</b>	0,615	0,242-1,565	0,308
Erkek	<b>KHB (vs Kontrol)</b>	0,166	0,008-3,629	0,254
	<b>HBV-Siroz (vs KHB)</b>	3,532	0,399-31,303	0,257
	<b>HBV-HCC (vs HBV-Siroz)</b>	2,310	0,401-1,198	0,189

**Tablo 24.** AFP ile lncRNA-GAS5 arasındaki korelasyon

	Spearman's rho	P değeri
<b>lncRNA-GAS5</b>	0,009	0,968

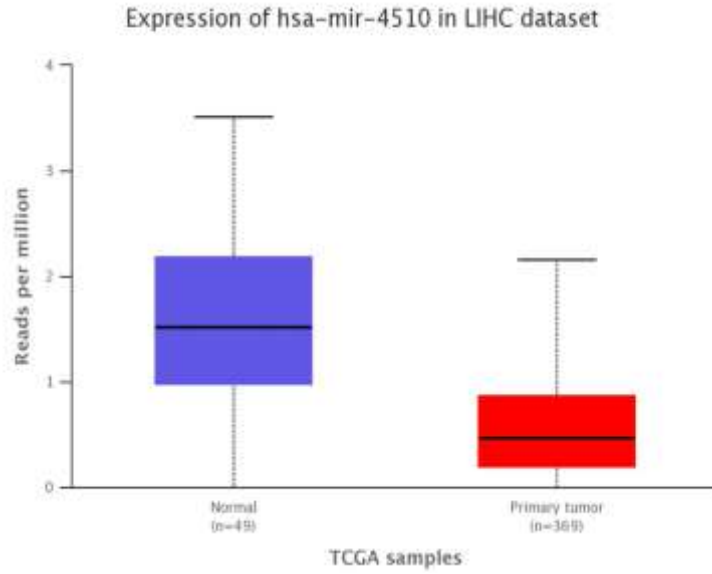
#### 6.4. MiRNA'lar için İn-Siliko Ekspresyon Profili

TCGA-LIHC veri setindeki miR-4510 ve miR-146b-5p'nin ekspresyona miR-TV ve UALCAN veri tabanlarından tümör ve normal dokuları arasındaki farklılıklar analiz edildi. Mavi ve kırmızı kutular sırasıyla normal ve birincil tümör dokularını gösterir (Şekil 24,25,26,27). Sonuçlar, miR-4510'un, miR-TV veritabanındaki sağlıklı deneklere (n=5) kıyasla LIHC deneklerinde (n=23) azalmış ekspresyon gösterdiğini ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığını gösterdi. UALCAN'a göre miR-4510 bağıl ekspresyonu tümör örneklerinde (n=369) normal (n=49) örneklere göre anlamlı derecede düşüktü, ayrıca istatistiksel olarak da fark bulundu. Bu hesaplamalı analiz, miR-4510'un HCC'de bir tümör baskılayıcı görevi gördüğünü göstermektedir. Öte yandan miR-146b-5p, miR-TV'de ekspresyonunun veritabanındaki sağlıklı deneklere (n=50) kıyasla LIHC deneklerinde (n=372) arttığını göstermektedir (Tablo 25). UALCAN web aracı kullanılarak TCGA veri tabanından da benzer sonuçlar elde edildi. MiR-146b-5p ekspresyonu, farklı veritabanlarına göre HCC tümör ve

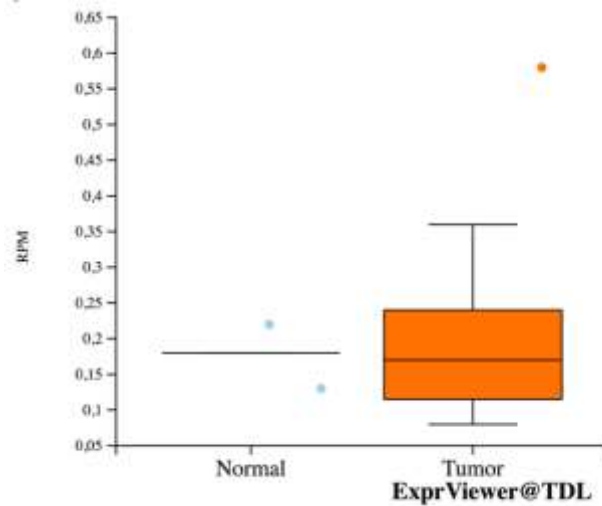
normal dokuları arasında istatistiksel olarak önemli farklılık seviyeleri gösteriyordu. Bu biyoinformatik analiz, miR-146b-5p'nin HCC'de bir onkogen görevi gördüğünü gösterir. Ancak miRNA bağıl ekspresyon seviyeleri için serumda aynı sonucu gösteremedik. Çalışmalarımızda HCC örneklerinde miR-146b-5p ekspresyon düzeyleri kontrollere göre azaldı.

**Tablo 25.** miR-TV ve UALCAN veri tabanlarındaki miR-4510 ve miR-146b-5p ekspresyonunun farklılıkları

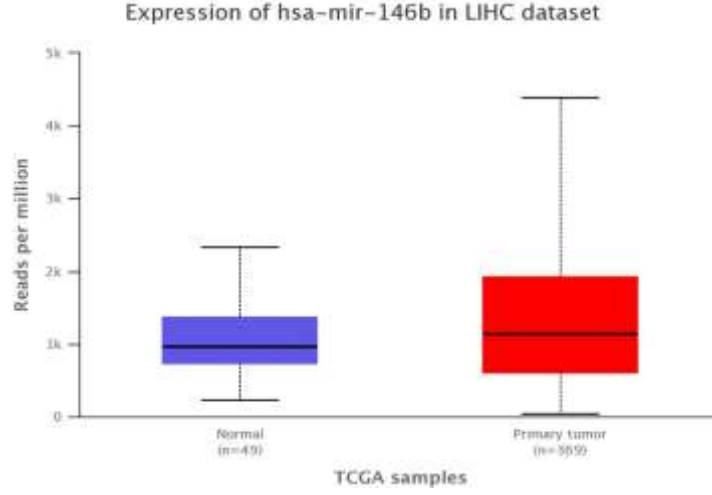
Normal ve Primer Tümörlerin karşılaştırılması	P değeri	
	miR-TV	UALCAN
	Tümör (23) Normal (5)	Tümör (369) Normal (49)
miR-4510	1	<b>2.43719489034788E-11</b>
	Tümör (372) Normal (50)	Tümör (369) Normal (49)
miR-146b-5p	<b>0.002778</b>	<b>7.75540000000907E-05</b>



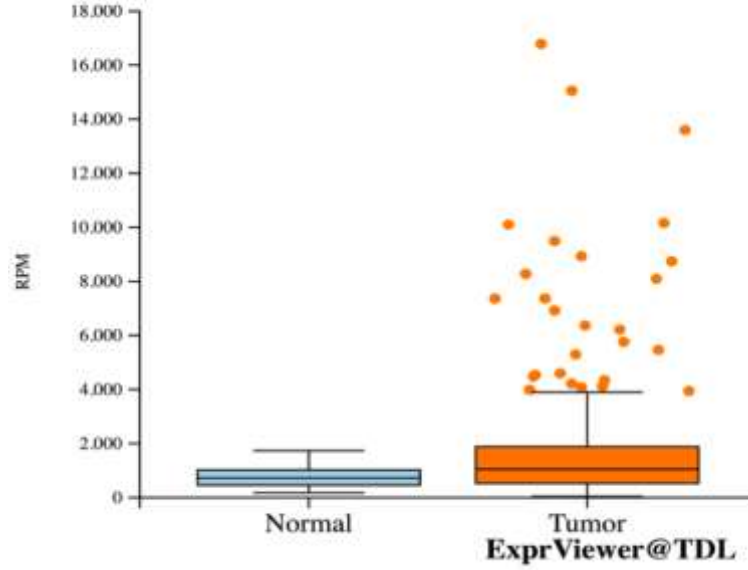
**Şekil 24.** UALCAN veri tabanındaki miR-4510'un ekspresyonu.



**Şekil 25.** miR-TV veri tabanındaki miR-4510 ekspresyonu grafiği



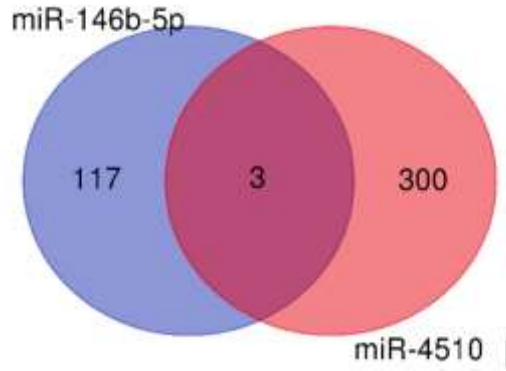
Şekil 26. UALCAN veri tabanındaki miR-146b-5p'nin ekspresyonu.



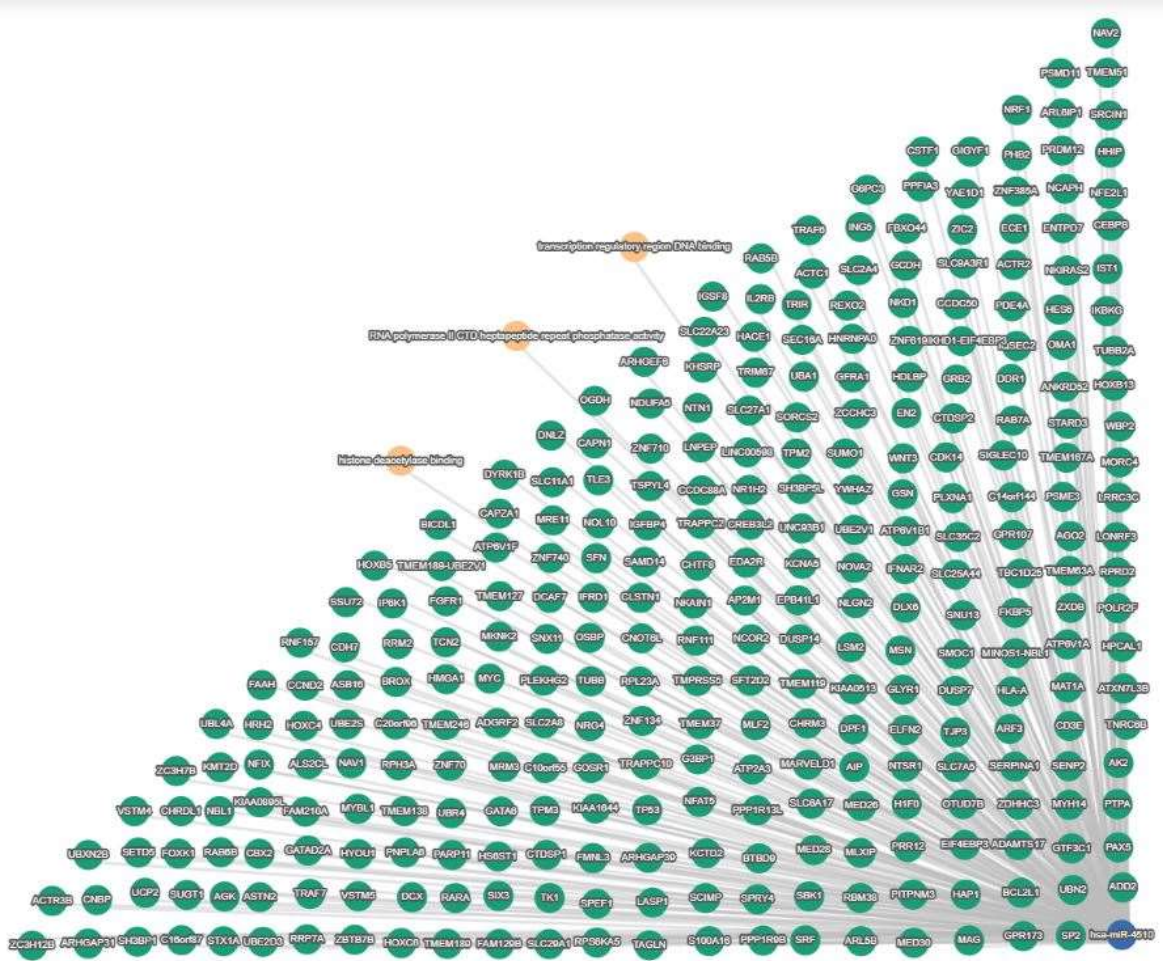
Şekil 27. miR-TV veri tabanındaki miR-146b-5p ekspresyonu grafiği

### 6.5. MiRNA'lar için Hedef Genlerin Belirlenmesi

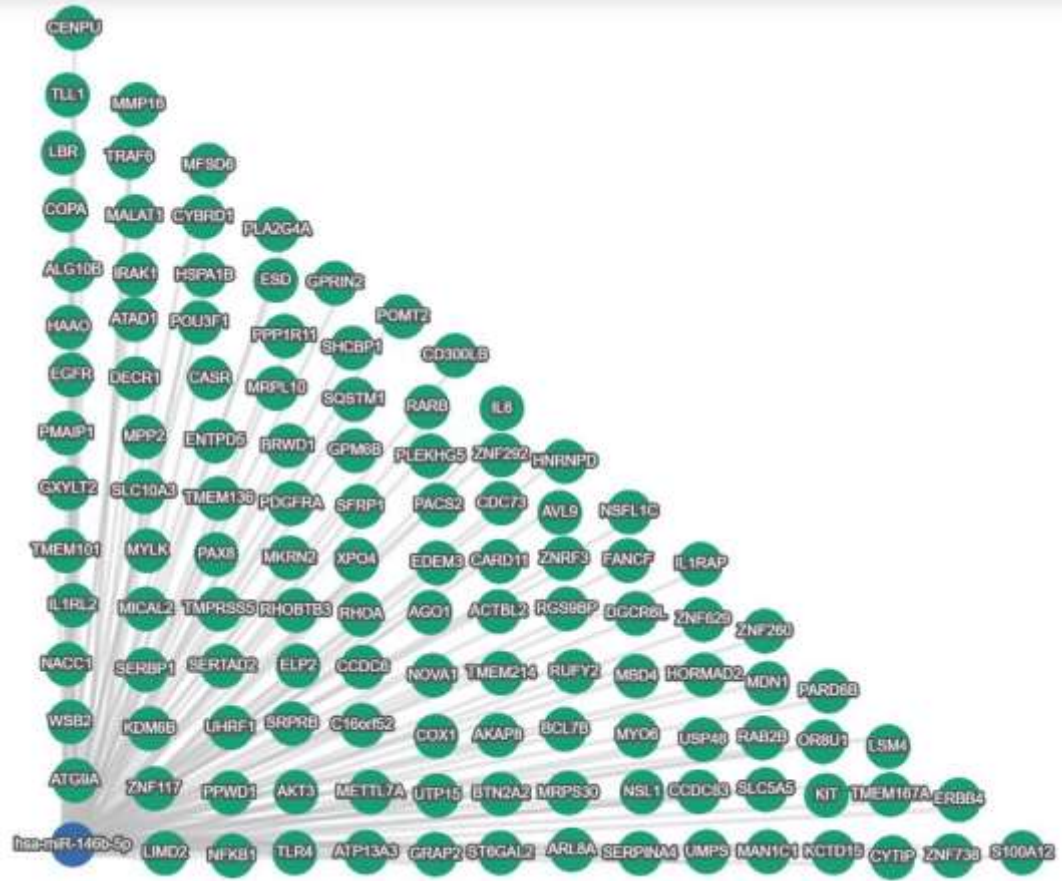
Hedef gen ağı, zayıf ve güçlü doğrulanmış genler olarak yapılandırılmış ve miRTargetLink İnsan Veritabanı kullanılarak "1" minimum paylaşılan hedef olarak kabul edilmiştir. miR-4510 için 303 gen (Şekil 29) ve miR-146b-5p için 120 gen (Şekil 30) hedef genler olarak belirlendi. Bir Venn diyagramı karşılaştırması ile miR-4510 ve miR-146b-5p'nin ortak olarak hangi genleri hedeflediğini bulundu (Şekil 28). Tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 6 (*TRAF6*), transmembran proteaz serin 5 (*TMPRSS5*) ve transmembran protein 167A (*TMEM167A*) genleri genellikle her iki miRNA için de hedef genlerdi. Ayrıca Tablo 26'da her iki miRNA için ortak ve benzersiz doğrulanmış hedef genleri gösterilmiştir.



Şekil 28. İki miRNA için ortak hedef genler.



Şekil 29. miR-4510 tarafından hedeflenen genler



Şekil 30. miR-146b-5p tarafından hedeflenen genler

**Tablo 26.** hsa-miR-4510 ve hsa-miR-146b-5p için ortak hedef genler

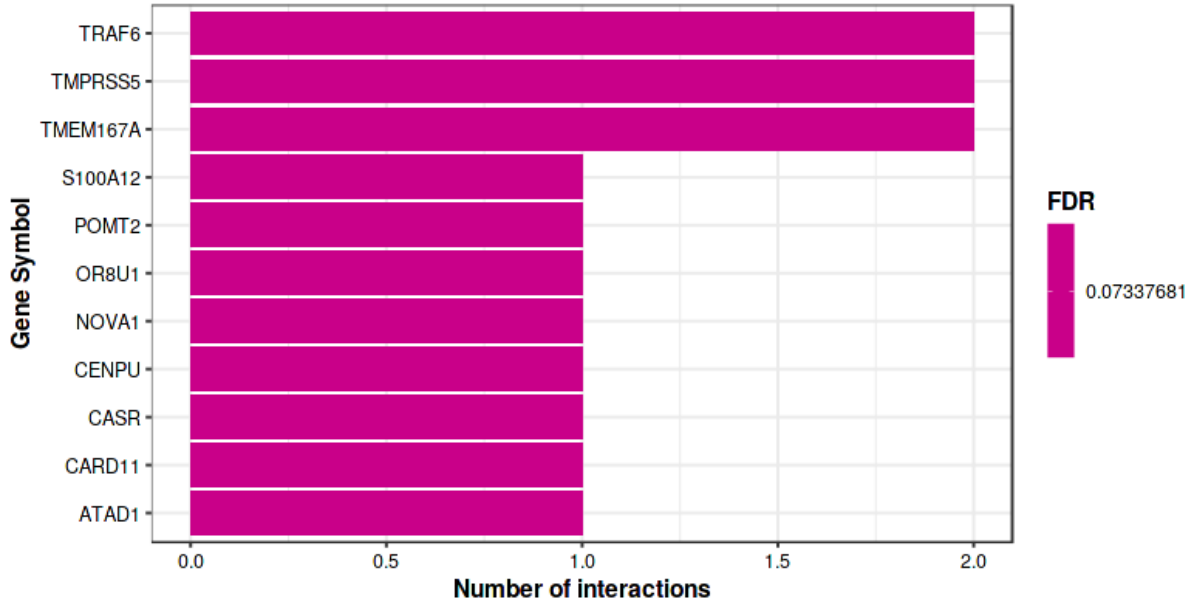
miRNA	Hedef Gen Sayısı	Genin Sembolü
miR-146b-5p miR-4510	3	<i>TRAF6 TMPRSS5 TMEM167A</i>
miR-146b-5p	117	<i>IL1RL2 NACCI AGO1 TLR4 ERBB4 HORMAD2 GRAP2 ZNF738 DECR1 CCDC6 OR8U1 IRAK1 DGCR6L BCL7B MRPL10 UMPS HNRNPD SHCBP1 HAAO MDN1 PLA2G4A KCTD15 MFSD6 ALG10B WSB2 HSPA1B LIMD2 PPP1R11 KIT RHOBTB3 MAN1C1 POU3F1 PDGFRA MBD4 SQSTM1 XPO4 NOVA1 AKAP8 MPP2 COX1 SLC5A5 CARD11 NSL1 MALAT1 GPM6B TMEM214 RAB2B EGFR NFKB1 POMT2 BTN2A2 MYLK ELP2 TMEM136 MYO6 TLL1 KDM6B ATAD1 GPRIN2 ACTBL2 COPA ESD ZNRF3 IL1RAP MMP16 S100A12 ATP13A3 ZNF117 GXYLT2 UHRF1 MICAL2 ATG9A LSM4 SERBP1 CYBRD1 PLEKHG5 TMEM101 C16orf52 FANCF CD300LB SRPRB CYTIP CCDC83 PMAIP1 PACS2 MRPS30 ZNF292 AKT3 SFRP1 ARL8A ST6GAL2 RHOA CENPU PAX8 UTP15 RGS9BP EDEM3 RUFY2 RARB PARD6B SERPINA4 IL6 ZNF260 MKRN2 ZNF629 SLC10A3 CDC73 BRWD1 PPWD1 METTL7A NSFL1C CASR AVL9 USP48 SERTAD2 ENTPD5 LBR</i>
miR-4510	300	<i>FAAH TRAF7 TJP3 OTUD7B ECE1 UBL4A SRCINI NCAPH TAGLN DCX MYBL1 CNBP CREB3L2 TK1 ATP6V1F SLC2A8 ARHGAP31 BICDL1 G3BP1 HOXB5 HRH2 ENTPD7 CHRDL1 SLC27A1 C10orf55 SUMO1 AP2M1 TP53 PPP1R13L VSTM4 STARD3 CLSTN1 CDH7 NTSR1 KIAA0895L PHB2 CSTF1 ARHGEF6 NKAIN1 MARVELD1 GPR107 RARA C16orf87 CDK14 HNRNPA0 IKBKG MKNK2 GSN SEC16A MYH14 ALS2CL HHIP ZC3H7B TMEM51 KMT2D FGFR1 NBL1 TUBB2A AGO2 UBE2S YAE1D1 DNLZ ASTN2 ACTR3B SPEF1 DUSP14 MSN TRIM67 RRP7A DUSP7 SUGT1 SLC22A23 CAPZA1 ARL6IP1 MORC4 TBC1D25 UBA1 LONRF3 CCDC50 SH3BP1 RPS6KA5 TPM2 STX1A TMEM189 PITPNM3 ZNF619 SH3BP5L HLA- A TRAPPC2 ELFN2 CCND2 KIAA0513 KIAA1644 RAB6B NRIH2 LSM2 ZIC2 TLE3 SENP2 CHTF8 TMEM127 OGDH ZNF710 UNC93B1 SPRY4 AGK NFIX ARF3 LNPEP SLC7A5 UBE2D3 ANKHD1- EIF4EBP3 PRR12 NAV2 ATP6V1A ZDHHC3 FMNL3 NKD1 ARHGAP39 GFRA1 NCOR2 MED26 BTBD9 CHRM3 CTDSP2 FAM129B SSU72 RPL23A SETD5 SAMD14 MAG UBE2V1 GPR173 GATA6 ARL5B ZNF740 HES6 POLR2F IP6K1 ING5 HOXC4 GRB2 ZCCHC3 ATXN7L3B TPM3 FKBP5 NFAT5 ZBTB7B HPCAL1 DCAF7 TRIR EIF4EBP3 EDA2R SFT2D2 C14orf144 HYOU1 TUBB134 PLXNA1 DDR1 RNF157 GTF3C1 SFN LRRC3C ZNF385A IGFBP4 UBXN2B HOXC6 TMEM119 NOVA2 HS6ST1 IFNAR2 MINOS1-NBL1 NTN1 PSME3 ZXDB RRM2 MRE11 TSPYL4 PSMD11 ASB16 CEBPB HMGA1 PTPA AK2 REXO2 SNX11 PPFIA3 KCTD2 MYC SLC25A44 RAB5B BCL2L1 SLC35C2 CAPN1 NAV1 OMA1 S100A16 GOSR1 TCN2 GATAD2A HAP1 SP2 ACTC1 DPF1 NFE2L1 TRAPPC10 WNT3 AIP C20orf96 SCIMP HACE1 GLYR1 WBP2 SLC11A1 PLEKHG2 CD3E IL2RB SNU13 PAX5 ATP6V1B1 LASP1 PPP1R9B BROX SMOC1 TMEM138 HOXB13 LINC00598 UBN2 G6PC3 IFRD1 GIGYF1 UBR4 ADAMTS17 ZC3H12B NOL10 CTDSP1 ZNF70 SLC2A4 SRF SERPINA1 ADD2 CBX2 KHSRP RNF111 RPRD2 MRM3 IST1 TMEM37 MED30 SIGLEC10 PDE4A SLC9A3R1 TMEM189-UBE2V1 NKIRAS2 OSBP NDUFA5 FBXO44 MED28 KCNA5 PNPLA6 RPH3A SIX3 EN2 ATP2A3 EPB41L1 HIF0 FOXK1 SLC29A1 NRG4 GCDH ADGRF2 FAM210A SBK1 MLF2 SLC6A17 NLGN2 TMEM63A UCP2 HDLBP RBM38 TNRC6B CCDC88A RAB7A DYRK1B CNOT6L ACTR2 IQSEC2 IGSF8 NRF1 SORCS2 YWHAZ ANKRD52 DLX6 VSTM5 PARP11 TMEM246 PRDM12 MLXIP MAT1A</i>

## 6.6. MiRNA'ların Ağ Tabanlı Hedef Gen Yolak Zenginleştirilmesi Ve Analizi

MIENTURNET analizi ile her iki miRNA'yı da hedefleyebilecek miRTarBase kullanan olası hedef genleri tahmin edilmiştir. MIENTURNET veri tabanındaki miRTarBase aracılığıyla miRNA'ların güçlü ve zayıf doğrulanmış genlerinin ağ analizi. Eşik, minimum miRNA hedef etkileşimi sayısı için 2 ve ayarlanmış p değeri (FDR) 1 olarak seçilmiştir. Bu zenginleştirme analizi sonucu Tablo 27 ve Şekil 31 ve 32'de gösterilmiştir.

**Tablo 27.** miRNA-hedef zenginleştirme analizi sonucu

Gen Sembolü	P değeri	FDR	Odd ratio	Etkileşim sayısı	microRNA 1	microRNA 2
<i>TMEM167A</i>	0.00219	0.0734	0.0469	2	hsa-miR-4510	hsa-miR-146b-5p
<i>TMPRSS5</i>	0.000490	0.0734	0.0223	2	hsa-miR-4510	hsa-miR-146b-5p
<i>TRAF6</i>	0.000736	0.0734	0.0273	2	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-4510

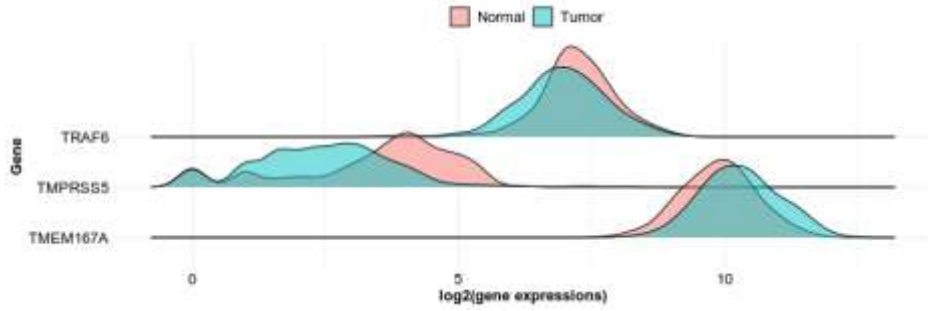


**Şekil 31.** miRNA-gen etkileşim sonucu



**Şekil 32.** İki miRNA'nın ve ortak hedef genlerinin ağ temsili. Mavi, farklı miRNA'lar; sarı, ortak hedef genler.

TNMplot'taki Çoklu gen analizinde tümör ve normal dokuda gen ekspresyonu farklılıkları analizi, RNA-Seq tabanlı veriler kullanılarak seçilen dokuda seçilen genlerin ortalamalarına genel bir bakış sağlar. *TRAF6*, *TMEM167A* ve *TMPRSS5* genleri, Karaciğer Hepatosellüler Karsinoma dokusu ile RNA-Seq verilerinde analiz edildi (Bartha & Györffy, 2021)(Bartha & Györffy, 2021) *TMEM167A* geni tümör dokusunda daha çok eksprese olduğu söylenebilirken, *TMPRSS5* ve *TRAF6* genleri tümör dokusunda daha az ekspresyona sahip olduğu bulundu. (Şekil 33).



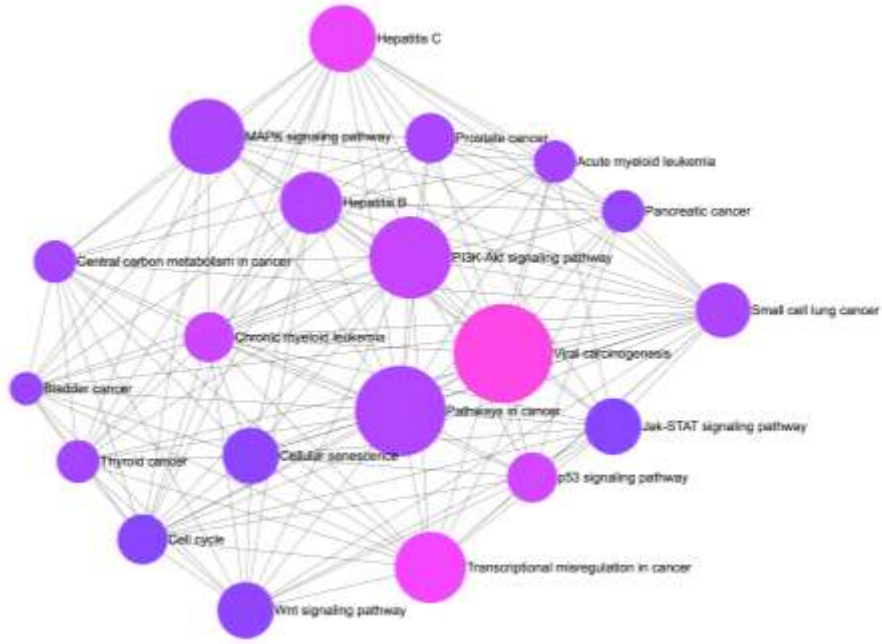
**Şekil 33.** TNMPlot ile LIHC ve normal dokularda miR-146b-5p ve miR-4510'un ortak hedef gen analizi. Veriler, *TRAF6*, *TMEM167A* ve *TMPRSS5* genlerinin araçlarına genel bir bakış sağlar.

Ek olarak, daha önce açıklandığı gibi miRTargetLink İnsan veritabanından elde edilen miR-146b-5p ve miR-4510 insan hedef genlerinin genetik protein-protein etkileşim yolunu ve global zenginleştirme analizini gerçekleştirmek için Network Analyst kullanıldı. MiR-4510' un 303 hedef geni ve miR-146b-5p'nin 120 hedef geni, Kyoto Genler ve Genler Ansiklopedisi (KEGG) zenginleştirmeyi gerçekleştirmek için Ağ analist platformunda çalıştırıldı. Sonuçlar P değerlerine göre görüntülendi. Ağ analisti jenerik protein-protein etkileşimi zenginleştirme görselleştirmeyle KEGG yolları ve mRNA'lar arasındaki potansiyel moleküler etkileşimler, çizgilerle gösterilmiştir. Daha büyük boyuta ve daha güçlü renge sahip düğümler, en ilgili yol olarak kabul edilir. MAPK sinyal yolu ve kanser yolağı, KEGG'de miR-146b-5p için istatistiksel olarak en anlamlı yollardı (Şekil 35). Toll benzeri reseptör sinyal yolu, Fosfolipaz D sinyal yolu, NF-kappa B sinyal yolu, T hücresi reseptör sinyal yolu, Hepatit B, Ras sinyal yolu, NOD benzeri reseptör sinyal yolu, EGFR tirozin kinaz inhibitör direnci, PI3K-Akt sinyal yolu, Rap1 sinyal yolu, Kolorektal kanser, Küçük hücreli akciğer kanseri ve Prostat kanseri diğer en yüksek zenginleştirme terimleriydi KEGG'de 62 yolak istatistiksel olarak anlamlı çıktı ( $P < 0,05$ ), ancak Tablo 29'da miR-146b-5p tarafından hedef olan genlerden HCC ile ilgili sadece ilk 10 yolak bir liste olarak gösterilmiştir. Kanser yollarındaki viral karsinogenez ve Transkripsiyonel yanlış düzenleme, KEGG'de miR-4510 için en önemli zenginleştirme terimleriydi (Şekil 34) ayrıca diğer 32 yolak istatistiksel olarak anlamlıydı ( $P < 0,005$ ) idi, ancak

miR-4510 tarafından hedeflenen genleri ve KEGG'deki HCC ile ilgili yollarını bir liste olarak gösterdik (Tablo 28). Ayrıca iki miRNA'nın hedef genlerinin tümünün protein-protein etkileşim zenginleştirme analizi yapıldığında bulunan KEGG'deki ilişkili yollar şekil 36'da ve genlerin dahil olduğu KEGG yollarını listesinde tablo 30'da gösterilmiştir. Bu genlerin kanserle ilgili KEGG yollarında zenginleştiği görülüyor.

**Tablo 28.** miR-4510 için HCC ile ilgili en önemli 10 KEGG yolu

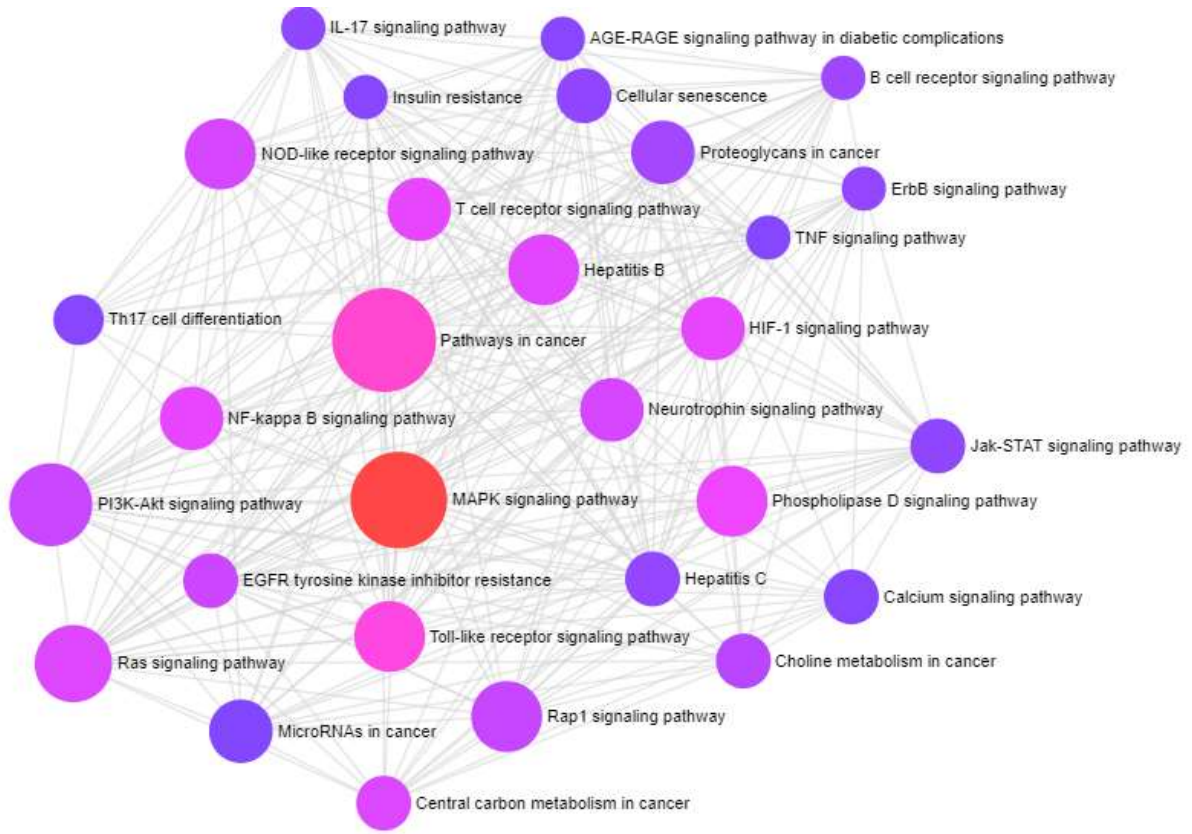
KEGG Yolu	Hits	P değeri	Adjusted P- value (FDR)	Genes in pathway
Viral karsinogenezis	10/201	8.33e-4	0.0879	<i>TP53, IKBKG, CCND2, HLA-A, GSN, SRF, UBR4, YWHAZ, GRB2, CREB3L2</i>
Kanserdeki transkripsiyonel yanlış düzenlenme	9/186	0.00184	0.0879	<i>BCL2L1, TP53, IL2RB, CCND2, MYC, CEBPB, RARA, PAX5, CDK14</i>
Hepatit C	8/155	0.00221	0.0879	<i>IFNAR2, TP53, TRAF6, IKBKG, MYC, YWHAZ, GRB2, PSME3</i>
p53 sinyal yolu	5/72	0.00437	0.139	<i>BCL2L1, TP53, CCND2, RRM2, SFN</i>
PI3K-Akt sinyal yolu	12/354	0.00659	0.161	<i>IFNAR2, BCL2L1, TP53, IL2RB, IKBKG, CCND2, MYC, YWHAZ, GRB2, CREB3L2, G6PC3, FGFR1</i>
Hepatit B	7/163	0.0111	0.227	<i>TP53, TRAF6, IKBKG, MYC, YWHAZ, GRB2, CREB3L2</i>
Kanser Yolu	15/530	0.0124	0.227	<i>IFNAR2, BCL2L1, TP53, IL2RB, TRAF6, IKBKG, CCND2, MYC, GRB2, RARA, FGFR1, RPS6KA5, HHIP, WNT3, TPM3</i>
MAPK sinyal yolu	10/295	0.0129	0.227	<i>TP53, TRAF6, IKBKG, MYC, SRF, GRB2, FGFR1, RPS6KA5, MKNK2, DUSP7</i>
Kanserdeki merkezi karbon sinyal yolu	4/65	0.0161	0.255	<i>TP53, MYC, FGFR1, SLC7A5</i>
Wnt sinyal yolu	6/158	0.0311	0.354	<i>TP53, CCND2, MYC, WNT3, SENP2, NKD1</i>



**Şekil 34.** miR-4510 için Ağ Tabanlı Hedef Gen Yolak Zenginleştirilmesi Ve Analizi

**Tablo 29.** miR-146b-5p için HCC ile ilişkili en önemli 10 KEGG yolu

KEGG Yolağı	Hits	P değeri	Adjusted P- value (FDR)	Yolakta bulunan hedef genler
MAPK sinyal yolağı	11/295	2.51e-6	7.97e-4	<i>EGFR, ERBB4, NFKB1, TRAF6, IRAK1, HSPA1B, PLA2G4A, AKT3, KIT, PDGFRA, ILIRAP</i>
Kanser Yolağı	13/530	2.68e-5	0.00236	<i>EGFR, NFKB1, TRAF6, AKT3, KIT, PDGFRA, IL6, RHOA, PAX8, RARB, PLEKHG5, PMAIP1, CCDC6</i>
Toll benzeri reseptör sinyal yolağı	6/104	5.63e-5	0.00298	<i>NFKB1, TRAF6, IRAK1, AKT3, IL6, TLR4</i>
Fosfolipaz D sinyal yolağı	6/148	3.92e-4	0.0114	<i>EGFR, PLA2G4A, AKT3, KIT, PDGFRA, RHOA</i>
NF-kappa B sinyal yolağı	5/100	4.78e-4	0.0114	<i>NFKB1, TRAF6, IRAK1, TLR4, CARD11</i>
HIF-1 sinyal yolağı	5/100	4.78e-4	0.0114	<i>EGFR, NFKB1, AKT3, IL6, TLR4</i>
T hücre reseptör sinyal yolağı	5/101	5.01e-4	0.0114	<i>NFKB1, AKT3, RHOA, CARD11, GRAP2</i>
Hepatits B	6/163	6.55e-4	0.0139	<i>NFKB1, TRAF6, IRAK1, AKT3, IL6, TLR4</i>
Ras sinyal yolağı	7/232	7.48e-4	0.0149	<i>EGFR, NFKB1, PLA2G4A, AKT3, KIT, PDGFRA, RHOA</i>
NOD benzeri reseptör sinyal yolağı	6/178	0.00104	0.0177	<i>NFKB1, TRAF6, IL6, RHOA, TLR4, CASR</i>



**Şekil 35.** miR-146b-5p için Ağ Tabanlı Hedef Gen Yolak Zenginleştirilmesi Ve Analizi

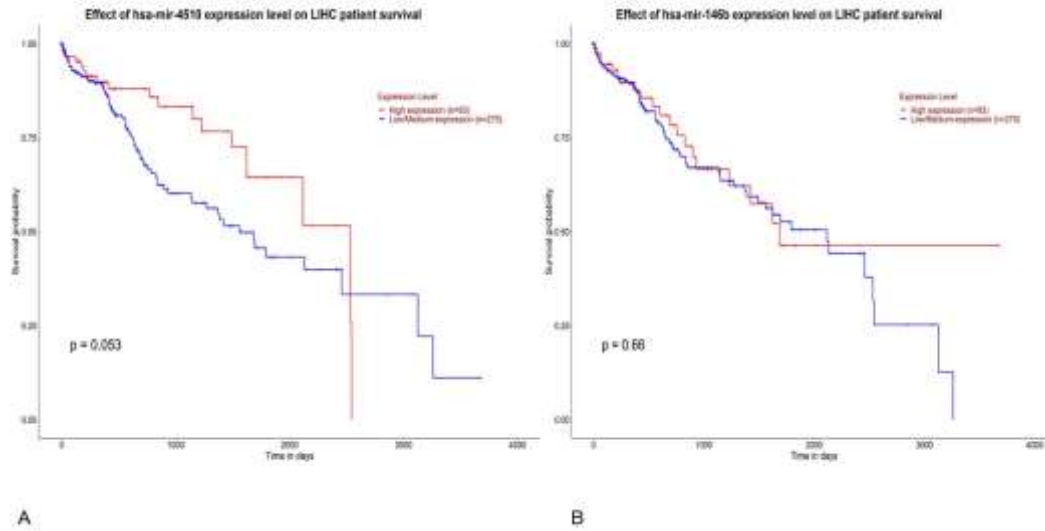
**Tablo 30.** miR-4510 ve miR-146b-5p nin her ikisinde hedef genlerinin ortak yolak analizi listesi

KEGG Yolakları	Hits	P değeri	Adjusted P- value (FDR)	Yolaktaki Hedeflenen Genler
MAPK sinyal yolağı	11/295	2.51e-6	7.97e-4	EGFR, ERBB4, NFKB1, TRAF6, IRAK1, HSPA1B, LA2G4A, AKT3, KIT, PDGFRA, IL1RAP
Kanser Yolağı	13/530	2.68e-5	0.00236	EGFR, NFKB1, TRAF6, AKT3, KIT, PDGFRA, IL6, RHOA, PAX8, RARB, PLEKHG5, PMAIP1, CCDC6
Toll benzeri reseptör sinyal yolağı	6/104	5.63e-5	0.00298	NFKB1, TRAF6, IRAK1, AKT3, IL6, TLR4
Fosfolipaz D sinyal yolağı	6/148	3.92e-4	0.0114	EGFR, PLA2G4A, AKT3, KIT, PDGFRA, RHOA
NF-kappa B sinyal yolağı	5/100	4.78e-4	0.0114	NFKB1, TRAF6, IRAK1, TLR4, CARD11
T hücre reseptör sinyal yolağı	5/101	5.01e-4	0.0114	NFKB1, AKT3, RHOA, CARD11, GRAP2
Hepatit B	6/163	6.55e-4	0.0139	NFKB1, TRAF6, IRAK1, AKT3, IL6, TLR4

**Tablo 30.** miR-4510 ve miR-146b-5p nin her ikisinde hedef genlerinin ortak yolak analizi listesi (devamı)

KEGG Yolakları	Hits	P değeri	Adjusted P- value (FDR)	Yolaktaki Hedeflenen Genler
Ras sinyal yolağı	7/232	7.48e-4	0.0149	EGFR, NFKB1, PLA2G4A, AKT3, KIT, PDGFRA, RHOA
NOD benzeri reseptör sinyal yolağı	6/178	0.00104	0.0177	NFKB1, TRAF6, IL6, RHOA, TLR4, CASR
EGFR tirozin kinaz inhibitör duyarlılığı	4/79	0.00175	0.0265	EGFR, AKT3, PDGFRA, IL6
PI3K-Akt sinyal yolağı	8/354	0.00201	0.0291	EGFR, ERBB4, NFKB1, AKT3, KIT, PDGFRA, IL6, TLR4
Rap1 sinyal yolağı	6/206	0.0022	0.0304	EGFR, AKT3, KIT, PDGFRA, RHOA, PARD6B
Kolorektal Kanser	4/86	0.00239	0.0317	EGFR, AKT3, RHOA, PMAIP1
Küçük hücreli akciğer kanseri	4/93	0.00318	0.0404	NFKB1, TRAF6, AKT3, RARB
Prostat kanseri	4/97	0.0037	0.0452	EGFR, NFKB1, AKT3, PDGFRA
İnflamatuvar Barsak Hastalığı	3/65	0.00884	0.0863	NFKB1, IL6, TLR4
Akut myeloid lösemi	3/66	0.00922	0.0863	NFKB1, AKT3, KIT
Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	3/66	0.00922	0.0863	EGFR, AKT3, RARB
Kanserdeki proteoglikanlar	5/201	0.01	0.0863	EGFR, ERBB4, AKT3, RHOA, TLR4
B hücre reseptör sinyal yolağı	3/71	0.0113	0.0942	NFKB1, AKT3, CARD11
Pankreatik kanser	3/75	0.0131	0.0989	EGFR, NFKB1, AKT3
ErbB sinyal yolağı	3/85	0.0182	0.127	EGFR, ERBB4, AKT3
HepatitC	4/155	0.0187	0.127	EGFR, NFKB1, TRAF6, AKT3
Hücrel Senesens	4/160	0.0207	0.137	NFKB1, AKT3, IL6, SQSTM1
Jak-STAT sinyal yolağı	4/162	0.0216	0.14	EGFR, AKT3, PDGFRA, IL6
IL-17 sinyal yolağı	3/93	0.0231	0.144	NFKB1, TRAF6, IL6
Tiroid kanser	2/37	0.0245	0.147	PAX8, CCDC6
Diyabette AGE-RAGE sinyal yolağı	3/100	0.0279	0.161	NFKB1, AKT3, IL6
İnsülin Duyarlılığı	3/108	0.034	0.189	NFKB1, AKT3, IL6
Kalsiyum sinyal yolağı	4/188	0.0348	0.191	EGFR, ERBB4, PDGFRA, MYLK
TNF sinyal yolağı	3/110	0.0356	0.192	NFKB1, AKT3, IL6
Kanserdeki microRNA'lar	5/299	0.046	0.236	EGFR, NFKB1, PDGFRA, RHOA, MMP16





**Şekil 37.** miR-4510 ekspresyon seviyesinin LIHC hasta sağkalımı üzerindeki etkisi (A). miR-146b-5p ekspresyon seviyesinin LIHC hasta sağkalımı üzerindeki etkisi (B). ( $p > 0.05$ )

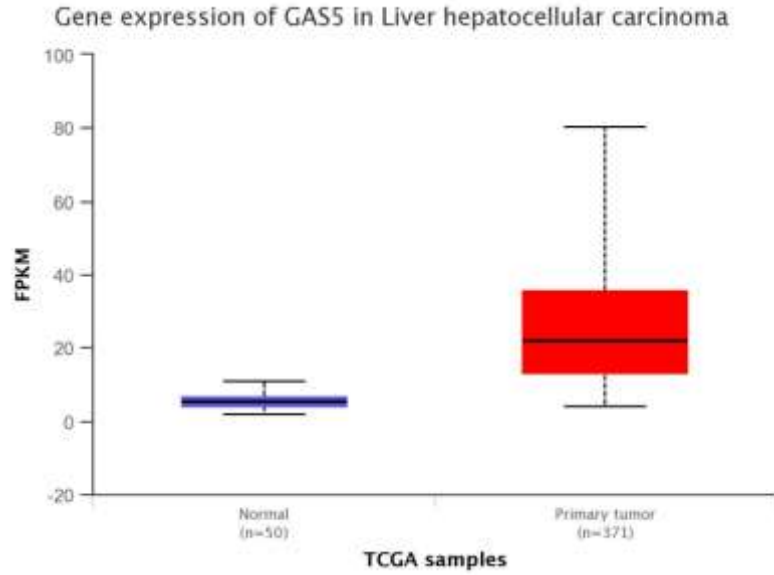
### 6.8. lncRNA GAS5 için İn-Siliko Ekspresyon Analizi

UALCAN veri tabanlarından (Şekil 38), TCGA-LIHC veri setindeki (Şekil 39) lncRNA GAS5'in ekspresyonunun tümör ve normal dokular arasındaki farklılıklar analiz edildi. Mavi ve kırmızı kutular sırasıyla normal ve birincil tümör dokularını gösterir. Sonuçlar, UALCAN'a göre lncRNA GAS5'in, bağıl ekspresyonu tümör örneklerinde ( $n=371$ ) normal ( $n=50$ ) örneklere göre anlamlı derecede yüksekti, ayrıca istatistiksel olarak da anlamlı bir fark bulundu. Bu hesaplamalı analiz, lncRNA GAS5'in HCC'de bir onkogen görevi gördüğünü göstermektedir. Ayrıca lncRNA GAS5 için TANRIC analizi yapıldığında ajcc neoplazma hastalık aşaması ve neoplazm histolojik evre arasındaki anlamlı bir istatistiksel sonuç elde edilememiştir, sırasıyla  $P=0,190$  ve  $P=0,522$  dir.

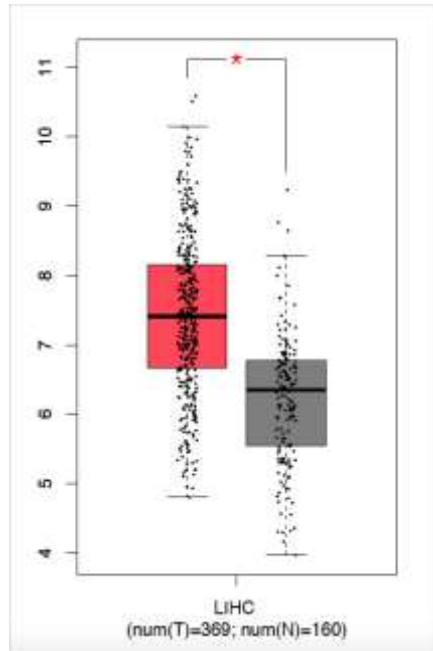
lncRNA GAS5 ENSEMBLE ID: ENSG00000234741 olarak bulunmuştur. Tablo 31'de, lncRNA GAS5 gen ekspresyonunun taban ortalamasını, Alzheimer Hastalığı ve kontrol grubu arasındaki  $\log_2$  kat farkını, ekspresyonundaki değişiklikleri göstererek kanserin LIHC tipindeki farklı ekspresyon yönünün arttığını ve bu kanserde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç verdiğini bulduk. Ayrıca LIHC kanser aşaması ile lncRNA GAS5 arasında bir korelasyon var mı diye araştırdığımızda anlamlı bir değer bulduk. TCGA veri setinde, uzun zincirli olmayan RNA (lncRNA) GAS5 geninin, hepatosellüler karsinom (LIHC) kanseri ve normal örnekler arasında anlamlı bir şekilde farklı eksprese edildiğini gösteriyor. GAS5 geninin farklı eksprese edilmesi, kanser süreçlerindeki değişikliklerle ilişkilendirilebilir ve bu da belirli kanser türlerinin anlaşılmasına ve hedeflenmiş tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

**Tablo 31.** lncRNA GAS5 gen ekspresyonun TCGA-LIHC veri setindeki analizi

Ensembl ID	Base mean	log2FC (AD/control)	lfcSE
ENSG00000234741	5,23E+09	1,88E+06	1,64E+05
Stat	P-value	Adjc.p-value	DEG direction
1,15E+07	1,28E-24	6,70E-23	UP
Cancer type	Correlation	P-value	Adjc.p-value
LIHC	3,79E+05	4,36E-09	5,37E-08



**Şekil 38.** UALCAN veri tabanındaki lncRNA GAS5'in ekspresyonu.



**Şekil 39.** TCGA veri tabanındaki lncRNA GAS5'in ekspresyonu

## 6.9. QIAGEN IPA ile lncRNA GAS5'in Ağ Tabanlı Hedef Gen Yolak Zenginleştirilmesi Ve Analizi

LncRNA GAS5 'in hedef genlerinin ve pathwaylerinin belirlenmesi için QIAGEN IPA programı kullanılmıştır. Buna göre lncRNA GAS5 ile ilişkili 17 molekül ve 33 tane anlamlı fonksiyon bulunmuştur. Hepatoselüler karsinoma ile lncRNA GAS5 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (P=0,063) (Tablo 32, Tablo 33). Buna göre bizim deneylerden elde ettiğimiz sonuç ile TCGA LIHC dataseti verileri uyumlu bulunmuş ancak QIAGEN IPA veri setindeki ekspresyon değerleri ile uyumlu bulunamamıştır.

Hastalığın mekanizmaları ve potansiyel tedavi hedefleri hakkında daha fazla anlayış sağlamak için LIHC için TCGA'nın RNA dizileme verilerini inceledik ve lncRNA GAS5 ile ilişkili genlerin ve biyolojik süreçlerin ağlarını görselleştirmeyi amaçladığımızda Şekil 40'ta gösterilen network ağı bulundu. Ayrıca LncSEA veritabanındaki miRNA ve hedef genlerini de bulup şekil 41'de gösterdik. Bu sayede hedef genlerini ve IPA sayesinde de yollarını bulmuş olduk.

**Tablo 32.** lncRNA GAS5 ile ilişkili hastalık ve fonksiyonlar

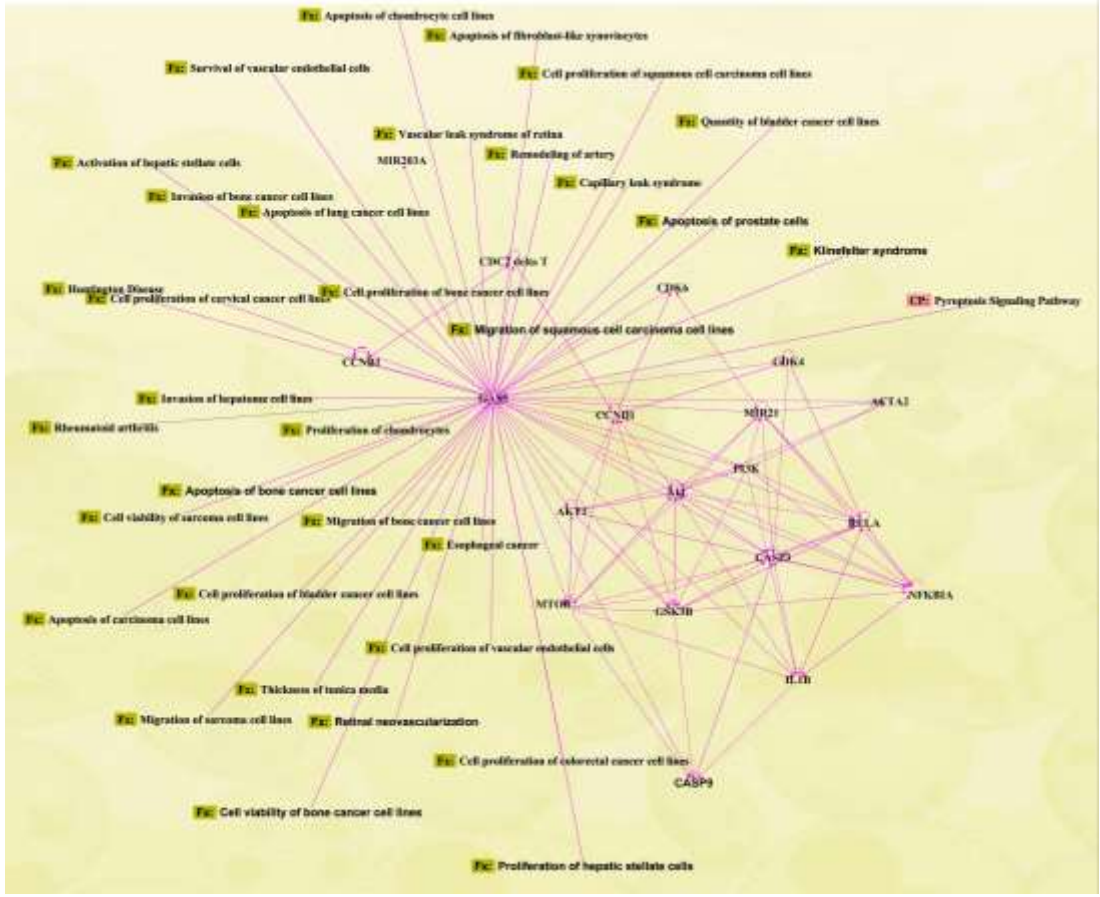
Kategoriler	Hastalıklar veya Fonksiyonlar İncelemesi	P-değeri
Hücrel Gelişim, Hücrel Büyüme ve Çoğalma	Mesane kanseri hücre hatlarının hücre çoğalması	<b>0,000263</b>
Kardiyovasküler Hastalık, Organizma Yaralanması ve Anomalileri	Kapiller sızıntı sendromu	<b>0,000789</b>
Doku Morfolojisi	Mesane kanseri hücre hatlarının miktarı	<b>0,000184</b>
Kardiyovasküler Hastalık, Göz Hastalığı, Organizma Yaralanması ve Anomalileri	Göz retinasının vasküler sızıntı sendromu	<b>0,000184</b>
Kardiyovasküler Sistem Gelişimi ve Fonksiyonu	Tunika media kalınlığı	<b>0,000237</b>
Hücre Ölümü ve Hayatta Kalma	Kondrosit hücre hatlarının apoptozu	<b>0,000315</b>
	Prostat hücrelerinin apoptozu	<b>0,000342</b>
	Fibroblast benzeri sinoviyositlerin apoptozu	<b>0,000973</b>
Hücrel Hareket	Kemik kanseri hücre hatlarının invazyonu	<b>0,00145</b>
Doku Morfolojisi	Arter yeniden şekillenmesi	<b>0,00145</b>
Kardiyovasküler Sistem Gelişimi ve Fonksiyonu, Göz Hastalığı, Organizma Gelişimi, Organizma Yaralanması ve Anomalileri, Görsel Sistem Gelişimi ve Fonksiyonu	Retina neovaskülarizasyonu	<b>0,00197</b>
Kardiyovasküler Sistem Gelişimi ve Fonksiyonu, Hücrel Gelişim, Hücrel Büyüme ve Çoğalma,	Vasküler endotel hücrelerin hayatta kalması	<b>0,00202</b>
Hücrel Hareket	Kemik kanseri hücrelerinin göçü	<b>0,00234</b>

**Tablo 32. lncRNA GAS5 ile ilgili hastalık ve fonksiyonlar (devamı)**

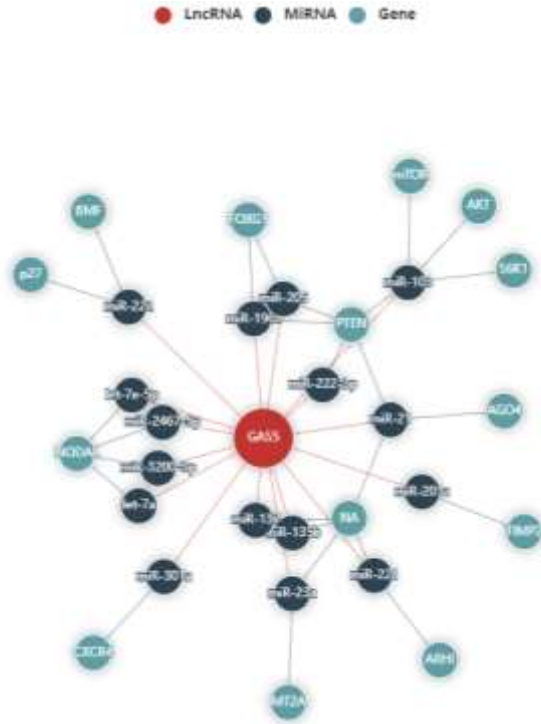
Kardiyovasküler Sistem Gelişimi ve Fonksiyonu, Hücrel Gelişim, Hücrel Büyüme ve Çoğalma, Bağ Dokusu Gelişimi ve Fonksiyonu, Sindirim Sistemi Gelişimi ve Fonksiyonu, Karaciğer Sistemi Gelişimi ve Fonksiyonu, Karaciğer Fibrozu, Karaciğer Çoğalması, Organ Gelişimi, Organizma Gelişimi, Doku Gelişimi	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Gelişimsel Bozukluk, Endokrin Sistem Bozuklukları, Kalıtsal Bozukluk, Organizma Yaralanması ve Anomalileri, Üreme Sistemi Hastalığı	Klinefelter sendromu	<b>0,00279</b>
Hücrel Hareket	Hepatoma hücre hatlarının invazyonu	<b>0,00297</b>
Hücre Ölümü ve Hayatta Kalma	Sarkoma hücre hatlarının hücre canlılığı	<b>0,00313</b>
Hücreden Hücreye Sinyalleşme ve Etkileşim, Bağ Dokusu Gelişimi ve Fonksiyonu, Karaciğer Sistemi Gelişimi ve Fonksiyonu, Karaciğer Fibrozu	Karaciğer stellat hücrelerinin aktivasyonu	<b>0,00355</b>
Hücrel Hareket	Kanserli hücre hatlarının göçü	<b>0,00371</b>
Hücrel Gelişim, Hücrel Büyüme ve Çoğalma, Bağ Dokusu Gelişimi ve Fonksiyonu, Doku Gelişimi	Kondrositlerin çoğalması	<b>0,00371</b>
Hücrel Hareket	Sarkoma hücre hatlarının göçü	<b>0,00418</b>
Hücre Ölümü ve Hayatta Kalma	Kemik kanseri hücre hatlarının hücre canlılığı	<b>0,00421</b>
Hücrel Gelişim, Hücrel Büyüme ve Çoğalma	Kanserli hücre hatlarının hücre çoğalması	<b>0,00733</b>
Hücre Ölümü ve Hayatta Kalma	Kemik kanseri hücre hatlarının apoptozu	<b>0,00739</b>
Hücrel Gelişim, Hücrel Büyüme ve Çoğalma	Kemik kanseri hücre hatlarının hücre çoğalması	<b>0,00762</b>
Kardiyovasküler Sistem Gelişimi ve Fonksiyonu, Hücrel Gelişim, Hücrel Fonksiyon ve Bakım, Hücrel Büyüme ve Çoğalma, Organizma Gelişimi, Doku Gelişimi	Vasküler endotel hücrelerinin hücre çoğalması	<b>0,0096</b>
Hücrel Gelişim, Hücrel Büyüme ve Çoğalma	Servikal kanser hücre hatlarının hücre çoğalması	<b>0,0113</b>
Hücre Ölümü ve Hayatta Kalma	Akciğer kanseri hücre hatlarının apoptozu	<b>0,0158</b>
Hücre Ölümü ve Hayatta Kalma	Karsinoma hücre hatlarının apoptozu	<b>0,0213</b>
Hücrel Gelişim, Hücrel Büyüme ve Çoğalma	Kolorektal kanser hücre hatlarının hücre çoğalması	<b>0,0213</b>
Kalıtsal Bozukluk, Nörolojik Hastalık, Organizma Yaralanması ve Anomalileri, Psikolojik Bozukluklar, İskelet ve Kas Bozuklukları	Huntington Hastalığı	<b>0,0296</b>
Kanser, Gastrointestinal Hastalık, Organizma Yaralanması ve Anomalileri	Yemek Borusu kanseri	<b>0,0297</b>
Bağ Dokusu Bozuklukları, İmmünojik Hastalık, İnflamatuar Hastalık, İnflamatuar Yanıt, Organizma Yaralanması ve Anomalileri, İskelet ve Kas Hastalıkları	Reumatoid artrit	<b>0,0345</b>
Kardiyovasküler Hastalık	Yüksek tansiyon	<b>0,0451</b>
Kanser, Gastrointestinal Hastalık, Karaciğer Sistem Hastalığı, Hepatosellüler karsinom, Karaciğer Hiperplazisi/Karaciğer Hiperproliferasyonu, Organizma Yaralanması ve Anomalileri	Hepatosellüler karsinom	0,063

**Tablo 33.** lncRNA GAS5'in HCC'deki fonksiyon analizi

<b>Kategori</b>	<b>Fonksiyon</b>	<b>Fonksiyon Açıklaması</b>	<b>P-değeri</b>
Hücrel Gelişim	çoğalma	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Hücrel Büyüme ve Çoğalma	çoğalma	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Organizma Yaralanması ve Anomalileri	Hepatosellüler karsinom	Hepatosellüler karsinom	0,063
Kardiyovasküler Sistem Gelişimi ve Fonksiyonu	çoğalma	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Hücre Ölümü ve Hayatta Kalma	apoptoz	Karsinoma hücre hatlarının apoptozu	<b>0,0213</b>
Hücrel Hareket	invazyon	Hepatom hücre hatlarının invazyonu	<b>0,00297</b>
Organizma Gelişimi	çoğalma	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Bağ Dokusu Gelişimi ve Fonksiyonu	çoğalma	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Bağ Dokusu Gelişimi ve Fonksiyonu	aktivasyon	Karaciğer stellat hücrelerinin aktivasyonu	<b>0,00355</b>
Sindirim Sistemi Gelişimi ve Fonksiyonu	çoğalma	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Karaciğer Sistemi Gelişimi ve Fonksiyonu	çoğalma	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Karaciğer Sistemi Gelişimi ve Fonksiyonu	aktivasyon	Karaciğer stellat hücrelerinin aktivasyonu	<b>0,00355</b>
Karaciğer Fibrozu	çoğalma	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Karaciğer Fibrozu	aktivasyon	Karaciğer stellat hücrelerinin aktivasyonu	<b>0,00355</b>
Karaciğer Çoğalması	çoğalma	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Organ Gelişimi	çoğalma	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Doku Gelişimi	çoğalma	Karaciğer stellat hücrelerinin çoğalması	<b>0,00273</b>
Hücreden Hücreye Sinyalleşme ve Etkileşim	aktivasyon	Karaciğer stellat hücrelerinin aktivasyonu	<b>0,00355</b>
Kanser	Hepatosellüler karsinom	Hepatosellüler karsinom	0,063
Gastrointestinal Hastalık	Hepatosellüler karsinom	Hepatosellüler karsinom	0,063
Karaciğer Sistemi Hastalığı	Hepatosellüler karsinom	Hepatosellüler karsinom	0,063
Hepatosellüler karsinom	Hepatosellüler karsinom	Hepatosellüler karsinom	0,063
Karaciğer Hiperplazisi/Karaciğer Hiperproliferasyonu	Hepatosellüler karsinom	Hepatosellüler karsinom	0,063



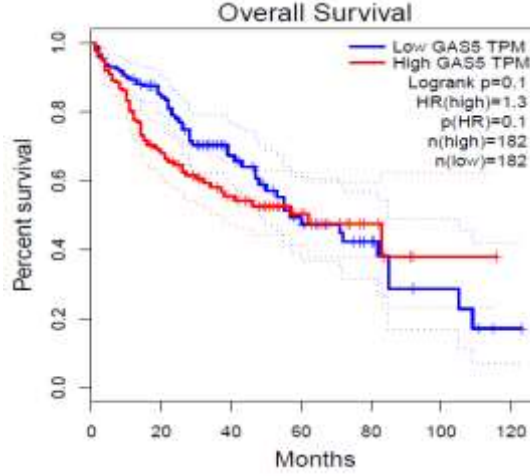
Şekil 40. QIAGEN IPA veri tabanındaki lncRNA GAS5 in ilişkili olduğu yollar



Şekil 41. LncSEA veribankasındaki lncRNA GAS5 için miRNA ve hedef gen network ağı

## 6.11. HCC'de lncRNA GAS5'in Prognostik Önemi

Pearson Korelasyonu iki değişken arasındaki ilişkinin ne kadar güçlü olduğunu ölçmek için kullanılmıştır. GAS5 gen ekspresyonunun vaka ve kontrolü ayırt etme kabiliyeti, gerçek pozitifliği (duyarlılık) yanlış pozitiflikle (özgüllük) ilişkilendiren alıcı işletim özellikleri eğrisi (ROC) çizilerek ve eğri altındaki alan (AUC) hesaplanarak hesaplanmıştır. Sağkalım Kaplan-Meier eğrisi ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi  $P < 0,05$  olarak belirlenmiştir (Şekil 42).



Şekil 42. GAS5 in HCC'deki sağkalım analiz grafiği

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

HCC insan kanserinin en yaygın türlerinden biri olmasına rağmen, şu anda HCC'nin tahmini ve/veya prognozu için altın standart bir yöntem bulunmamaktadır. HCC için en önemli risk faktörlerinden biri kronik HBV'dir ve ayrıca HBV pozitif olan hastaların HCC geliştirme olasılığı enfekte olmayanlara göre 100 kat daha fazladır (Bosch et al., 2005). Dahası, HBV'nin gelecekte dünya çapında 350-400 milyon kişiyi enfekte etmesi beklenmektedir (Yang et al., 2010). Epidemiyolojik araştırmaların çoğu, HCC vakalarının oldukça düşük bir sağkalım oranına sahip olduğunu keşfetmiştir. Çoğu HCC vakası hemen tanı alamamaktadır. Bu nedenle, HCC'nin erken teşhisi için non-invaziv yeni biyobelirteçler gereklidir.

Bununla birlikte, günümüzde mevcut olan serum belirteçleri kullanıldığında, HCC'ler genellikle geç bir aşamada keşfedilmektedir. Bir literatür taramasında, AFP, DCP ve SCCA-IgM Cs'nin HCC'nin erken tanı ve prognozundaki güvenilirliği karşılaştırılmıştır (Krek et al., 2005). İncelenen üç biyobelirtecin doğruluğunun yetersiz olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma aynı zamanda erken evre HCC için evrensel, son derece hassas ve spesifik biyobelirteçlerin olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak, karaciğer onkologları HCC'nin erken teşhisi için etkili noninvaziv biyobelirteçlerin geliştirilmesine odaklanmaya devam etmektedir.

Mikro RNA'ları kanserle ilişkilendiren 2002'deki ilk yayından bu yana, miRNA'ların karsinogenez sürecinde metastaz, invazyon, proliferasyon, hücre döngüsü ve apoptoz dahil olmak üzere bir dizi rol oynadığı açık hale gelmiştir (Chi & Zhou, 2016). Mikro RNA'ların ekspresyon profilinin hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde gen ekspresyonunu düzenledikleri için HCC'nin gelişimini ve ilerlemesini teşhis etmek ve anlamak için yararlı olduğu bulunmuştur (Jin et al., 2019; Murakami et al., 2006; Qi et al., 2011). Spesifik miRNA dizilerini tespit etme ve ölçme yeteneği, özellikle kanser alanında hastalıkların teşhisi ve izlenmesi olasılığını ortaya çıkarmıştır (Fleischhacker & Schmidt, 2007).

HCC'nin erken teşhisi için miRNA'ların biyobelirteç olarak potansiyeli hala fark edilmemiştir, ancak çeşitli popülasyonlarda ve HCC aşamalarında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Xu et al., 2020). MiRNA'lar, HCC'de anormal ekspresyon profilleri sergiledikleri için, özellikle erken, pre-semptomatik hastalığın teşhisi ve HCC'nin prognozu için umut verici biyobelirteçlerdir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, miRNA'ların hücre serum ve plazmada kanser hastalarında sağlıklı insanlardan farklı seviyelerde bulunduğu öne sürülmüştür ve bu da HCC'yi teşhis etmek için dolaşımdaki RNA'ların kullanılması alanını vurgulamaktadır (Gramantieri et al., 2007). Dolaşımdaki miRNA'ların da

HCC progresyonu sırasında etkilenmesi beklenmektedir çünkü HCC’de birçok miRNA düzensizdir. Bazı miRNA’lar HCC hastalarının serumunda ekspresyonu azalmaktadır. MiR-16 ve miR-199a serum seviyeleri HCC hastalarında kronik karaciğer hastalarına veya kontrol grubuna göre daha düşüktü ve belirlenmiş biyobelirteçlerden daha duyarlıydı (Huang et al., 2009; Meng et al., 2007). Bu sonuçlar miR-16’nın daha hassas bir HCC teşhisi için bir serum biyobelirteci olarak kullanılabilceğini düşündürmüştür.

Dolaşımdaki ekspresyonu azalan miRNA’lar dışında, HCC hastalarının serumundaki dolaşımdaki miRNA seviyelerinin birçoğu artmıştır. Örneğin, miR-221’in serum seviyesinin HCC hastalarında 4,8 kat arttığı gösterilmiştir (Li et al., 2011). Sağlıklı hastaların miR-92a serum seviyeleri HCC hastalarınınkine kıyasla düşük bulunurken, miR-92a’nın HCC hastalarının karaciğerlerinde güçlü bir şekilde ifade edildiği gösterilmiştir (Murakami et al., 2006). MiR-21, miR-122 ve miR-223 serum düzeyleri 101 HCC hastası, 89 sağlıklı birey ve 48 hepatit B hastasında incelenmiştir (Su et al., 2009). Her üç kan miRNA seviyesinin de HCC hastalarında sağlıklı kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olduğu keşfedilmiştir. Bununla birlikte, kronik hepatitli hasta grubunun miRNA serum seviyelerinin yüksek olduğu keşfedilmiştir. Bu sonuçlar, HCC hastaları ile kronik hepatit hastaları arasında ayırım yapmayı daha zor hale getirebilir. Bu sonuçlar, sadece HCC’nin değil miRNA’ların da karaciğer hasarını teşhis etmek için kullanılabilceğini düşündürmektedir. miR-21’e ek olarak diğer üç miRNA’nın, miR-221, miR-222 ve miR-224, farklı ifadelerine sahip olduğu keşfedilmiştir (Borel et al., 2012). Araştırdığımız miR-146b-5p ekspresyonunun HBV-HCC grubunda kontrol ve diğer gruplara kıyasla azaldığı görülmüştür.

MikroRNA, HCC için biyobelirteç olarak çalışılan tek nükleik asitler değildir. LncRNA da potansiyel biyobelirteçler olarak çalışılmıştır. Li ve arkadaşları, HCC’de ekspresyonu artan lncRNA’ları belirlemek için birden fazla veri tabanını incelemiş ve ardından biyobelirteç olarak faydalarını değerlendirmek için bağımsız bir HCC kohortundan ve kontrol hastalarından alınan serum örneklerini kullanmıştır (Li et al., 2015). Bu çalışma sayesinde, iki lncRNA potansiyel biyobelirteç olarak tanımlanmıştır: HULC ve Linc00152, her ikisi de HCC’li hastaların plazmasında yukarı regüle edilmiştir. HCC tanısı için AUROC, HULC ve Linc00152 için sırasıyla 0,78 ve 0,85 idi. HULC ve Linc00152 kombinasyonu 0,87 AUROC verirken AFP ilavesi AUROC’yi 0,89’a yükseltmiştir.

Araştırmacılar, hepatit B virüsüne (HBV) bağlı hepatosellüler karsinomlu (HCC) bireylerin plazma ve serumlarında ve karaciğer tümör dokularında bulunan sıklıkla düzensiz miRNA’ları inceliyor. MiR-21, MiR-26, MiR-122, MiR-125b, MiR-192, MiR-206, MiR-222, MiR-223 ve

MiR-224, HBV-HCC'li hastalardan sıklıkla bildirilen düzensiz dolaşımdaki miRNA'lardır (Xu et al., 2020). Bununla birlikte, diğer miRNA'lar, çalışmalar arasında veya tümör dokusu ile serum veya plazma arasında tutarsız veya farklı düzensizlik profilleri sergilemiştir. Örneğin, miR-122 HCC dokusunda sıklıkla ekspresyonu azalmıştır (Budhu et al., 2008; Peng Gao et al., 2011; Thurnherr et al., 2016), ancak dolaşımdaki miRNA seviyeleri farklı çalışmalarda hem arttığı hem de azaldığı bulunmuştur (Y. Li et al., 2017; Qi et al., 2011; Xu et al., 2011; Zhou et al., 2011). miR-18a, miR-21, miR-221, miR-222 ve miR-224 karaciğer tümör dokularında ekspresyonu artan miRNA'lar olarak bildirilirken miR-26a, miR-101, miR-122, miR-125b, miR-145, miR-199a, miR-199b, miR-200a ve miR-223 ekspresyonu azalan miRNA'lar olarak bildirilmektedir. Bazı araştırmacılar hem HCC hastalarında hem de kronik hepatit hastalarında bu seviyelerin daha yüksek olduğu verisine dayanarak, miR-122'nin yüksek kan seviyelerinin HCC'nin kendisinden ziyade karaciğer hasarından kaynaklanabileceğini varsaymaktadır (Qi et al., 2011; Xu et al., 2011). HCC hastalarının dokularında ve serumlarında miRNA ekspresyonunu çeşitli değişkenlerin kontrol etmesi de mümkündür. Viral ilişkili HCC'nin patogenezinin anlaşılması, bu oldukça kötü huylu kanser türünün etkili bir şekilde önlenmesi ve tedavisinin geliştirilmesi için önemlidir (Bréchet et al., 2000; Thorgeirsson & Grisham, 2002). Bu sonuçlar, miRNA'ların invazif olmayan bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesine dair umudu göstermektedir (JLopez-Berestein & GSood, 2011). Çalışmamızın in-silico kısmında miR-146b-5p'nin dokuda arttığı ancak in-vivo kısmında miR-146b-5p'nin serumdaki ekspresyonunun azaldığı görülmüştür ki bu da HBV'ye bağlı HCC'de doku ve serumda farklı seviyelerde olabileceğini gösteren bir kanıttır.

Metastazla ilişkili akciğer adenokarsinom transkripti 1 (MALAT1) uzun kodlamayan RNA, HCC dokularında tümöre komşu dokulara göre daha yüksek bulunmuş ve MALAT1 ile miR-146b-5p arasında tamamlayıcı bir dizi ve bu iki kodlamayan RNA arasında negatif bir ilişki tespit edilmiştir (C. Li et al., 2017). Bu bulgular MALAT1'i miR-146b-5p'nin moleküler bir sünger olarak tanımlamıştır ve bu da miR-146b-5p ifadesinin HCC'de neden daha düşük olduğunu açıklayabilir. Çalışmamızda, miR-146b-5p ekspresyonu ilk kez HBV-HCC gruplarında serumda diğerlerine göre önemli ölçüde azalmış olarak keşfedilmiştir.

MiR-4510, HCC hücrelerinde glypican-3 (GPC3) ekspresyonunu inhibe eder ve HCC tümörlerinde önemli ölçüde azalmıştır (Cartier et al., 2017; Jalvy-Delville et al., 2012; Maurel et al., 2013), bu çalışmalar neden serumda ekspresyonunu gösteremediğimizi açıklayabilir. miR-4510, HCC hücre hatlarında proliferasyon durması ve apoptozu indükleyen GPC3 ekspresyonunun en güçlü inhibitörüdür (Hoshida et al., 2009; Zynger et al., 2008). Ek olarak,

miR-4510 ekspresyonu GIST'lerde komşu normal dokulara kıyasla azalmıştır. miR-4510'un aşırı ekspresyonu apolipoprotein C-II'yi (APOC2) hedefleyerek GIST-882 hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu inhibe etmiştir. Bu sonuçlar miR-4510'un aşırı ekspresyonunun AKT ve ERK1/2 fosforilasyonunu da inhibe ettiğini, matris metalloproteinaz 2 (MMP2) ve MMP9 ekspresyonunu azalttığını göstermiştir (Chen et al., 2020).

Mevcut çalışmada, miR-146b'nin HBV-HCC hasta serumlarında, HBV-Siroz hastalarının serumlarında ve KHB hastalarının serumlarında sağlıklı serumlara kıyasla ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. miR-146b'nin ekspresyonundaki artış, komşu normal karaciğer dokularına kıyasla TGCA-LIHC tümör dokusunda da gözlenmiştir. Çalışmamız ilk olarak miRNA-146-5p serum ekspresyon seviyesinin HCC'de önemli ölçüde düşük olduğunu göstermiştir. Ancak miRNA-4510 tüm çalışma gruplarında serumda karşılaştırılabilir düzeyde tespit edilememiştir. miR-4510 kontrol grubunda sadece üç kişide bulunduğu için kalitatif bir kriter olarak değerlendirilmiştir. Hepatit B virüsü enfeksiyonundan sonra ekspresyonu azalmış veya baskılanmış olabilir.

Çok sayıda araştırma çalışmasının değerlendirilmesi, miRNA'ların protein kodlayan genlerin büyük çoğunluğunu doğrudan etkileyebileceği sonucuna varmıştır. miRNA işlevlerini ve bunların hastalık gelişimi üzerindeki sonuçlarını anlamak, miRNA hedeflerinin tanımlanmasını gerektirir. miRNA'lar ve hedef genleri arasındaki geri beslemenin kontrolü, HCC gelişimi için çok önemlidir. Tek bir miRNA, HCC fenotipinin oluşumunda ve sürdürülmesinde rol oynayan birçok geni hedefleyebilir. Bununla birlikte, miRNA'ların hedef genleri ile ilişkisi ve bu ilişkilerin HCC gelişimi üzerindeki etkisi nadiren araştırılmaktadır. Bu çalışmada, miR-146b-5p ve miR-4510'un prediktif değeri olabilecek hedef genlerini de araştırdık.

miR-146b-5p prostat kanseri, pankreas kanseri ve glioblastoma gibi solid tümörlerde sıklıkla ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (Y. Li et al., 2013). HCC ile ilişkili miRNA'ların analizi, miR-146b-5p'nin HCC'yi düzenleyen en yüksek sayıda işaret genine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, miR-146b-5p'nin HCC'nin ilerlemesinde önemli roller oynayabileceği ve HCC'nin tahmini için yeni biyobelirteçler olabileceği düşünülmüştür (Ding et al., 2017). Bununla birlikte, bu çalışmada deneysel doğrulama eksikliği ve ekspresyon profili verilerinin ortak analizi gibi sınırlamalar vardı. Ancak bizim verilerimiz miR-146b-5p ifadesinin deneysel doğrulamasını ve analizini sağlamaktadır.

miR-146b eksikliği, TRAF6 ve IRAK1 ekspresyonunun yukarı regülasyonu ve hem T24T hem de UMUC3 hücrelerinde MMP2 proteininin bolluğunda dramatik bir zayıflama ile sonuçlanmıştır. Dahası, MMP2, mesane kanseri istilasına aracılık etmesinden sorumlu miR-146b ekspresyonunun azaltıcı efektörü olarak tanımlanmıştır (Chi & Zhou, 2016; Zhu et al., 2019). Ayrıca, miR-146b-5p ve TRAF6 mRNA arasındaki ikili etkileşimi, miRNA-mRNA dublexi arasındaki güçlü bağlanma enerjisini doğrulamaktadır. Bu kanıt, TRAF6'nın HCC'de miR-146b-5p'nin doğrudan hedef geni olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, miR-146b-5p ve hedefi TRAF6'nın hepatoselüler kanserdeki işlevinin daha fazla karakterizasyon ve doğrulamaya ihtiyacı vardır. Ayrıca, bu tahminler gelecekte deneysel doğrulamaya dayalı mekanistik rollerinin anlaşılmasıyla doğrulanmalıdır. miR-146b-5p, hesaplamalı klinik araştırma ile HBV-HCC için öngörücü bir biyobelirteç olabilir.

Bildirilen çalışmaların çoğu IRAK1 ve TRAF6'yı miR-146 ailesinin temel hedefleri olarak tanımlamaktadır (Paterson & Kriegel, 2017). Bir çalışmada miR-146b'nin NFKB yolu üzerinde negatif geri beslemeli bir tümör baskılayıcı olarak rolü vurgulanmıştır ve miR-146b'nin ekspresyonundaki artışın tümörigenez üzerinde moleküler bir fren olabileceğini düşündürmektedir (Bhaumik et al., 2009; Hou et al., 2009; Xiang et al., 2014). Toll benzeri reseptör düzeneği (TLR), IRAK1 ve TRAF6'nın TAK/TAB kompleksi ile birlikte uyarılması, ardından IKK kompleksi ve NFKB'nin aktivasyonunu sağlayarak enflamatuar/immün yanıtın indüklediği çekirdeğe translokasyonla sonuçlanır. Bu da enflamatuar yanıt genlerini ve MIR-146 ekspresyonunu indükler (Paterson & Kriegel, 2017). Ayrıca, Liu ve arkadaşları miR-146b-5p'nin doğrudan TRAF6'yı hedefleyerek gliomalarda antitümör etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur (Liu et al., 2015). Kanıtlar ayrıca miR-146b-5p'nin in vitro ve in vivo olarak TRAF6/p-Akt sinyal yolağını inhibe ederek tümör baskılayıcı olduğunu doğrulamıştır (C. Li et al., 2017). In vitro olarak, miR-146b-5p'nin artan ekspresyonunun MHCC97-H hücrelerinde TRAF6 mRNA ifadesini inhibe ettiği ve Hep3B hücrelerinde miR-146b-5p'nin azalan ekspresyonunun TRAF6 ifadesini indüklediği ortaya konmuştur. Mir-146b-5p'nin TRAF6 aracılı p-Akt fosforilasyonunu inhibe ederek tümör büyümesini ve metastazı engellediğini göstermişlerdir. MiR-146b-5p ekspresyonunun dört HCC hücre hattında (MHCC97-H, SMMC-7721, Hep3B ve HepG2) ve bir insan ölümsüz karaciğer hücre hattında (LO2) azaldığı gösterilmiştir. miR-146b-5p knock-downun Hep3B hücrelerinde p-Akt ekspresyonunu artırdığı, miR-146b-5p overexpressionun ise MHCC97-H hücrelerinde p-Akt ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (C. Li et al., 2017). TRAF6 aşırı ekspresyonu tümörigenez ve tümör gelişimi ile yakından ilişkilidir. TRAF6, kanserde yer alan farklı sinyal yollarını etkiler ve tümör hücresi proliferasyonunu, hayatta kalmayı, apoptozu ve invazyonu düzenler. TCGA ve

GEO'dan elde edilen istatistiklere göre, TRAF6'nın yüksek ekspresyonu, TRAF6'nın düşük ekspresyonuna kıyasla kötü prognozla önemli ölçüde ilişkilidir (Li et al., 2020). Biz de çalışmamızda benzer sonuçlar bulduk.

Bu makalelerin çoğu, miR-146b-5p'nin IRAK1, TRAF6 ve NF-KB sinyalizasyonunun düzenlenmesine aracılık ederek inflamatuvar hücrelerde anahtar rol oynadığını ima etmektedir. Bu heyecan verici immün-onkoloji ve immünoterapi çağında, miR-146b-5p'yi bu açıdan incelemek ilginç olacaktır. miR-146b-5p'nin HCC'deki rolünün başlangıçta tahmin edilenden daha karmaşık olması mümkündür. miR-146b-5p ve KEGG analizi yoluyla kanser oluşumuna dahil olduğu belirlenen genler, HCC gelişimi ile yakından ilişkili olabilir. miR-146b-5p'nin rolü birçok kanserde ortaya konmuş olsa da, HCC'deki rolü ve işlevi hala belirsizdir. Bu çalışmalarda nispeten küçük örneklem boyutları kullanılmıştır ve bu da neden birbirlerini tamamen desteklemediklerini açıklayabilir. Yine, herhangi bir somut sonuca varılmadan önce bu kavramın daha fazla araştırılması gerekmektedir. miR-146b-5p ifadesinin, HBV enfeksiyonundan kaynaklanan karaciğer kanserinde, diğer mekanizmalardan kaynaklanan karaciğer kanserine kıyasla farklı şekilde düzenlenmiş olması mümkündür. Birlikte ele alındığında, yukarıdaki sonuçlar miR-146b-5p aşağı regülasyonunun klinik hepatoselüler karsinom hastaları için yeni bir prognostik biyobelirteç olarak hizmet etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Mevcut çalışmamızda miRNA ifade düzeylerini değerlendirmek için RT-PCR ve HCC'de miRNA/hedef gen zenginleşmesi üzerine bir biyoinformatik analiz gerçekleştirdik. Ayrıca TCGA'dan LIHC verilerini topladık ve bu in silico örnekleri HCC'de bu miRNA'ların hangi genleri hedeflediğini belirlemek için kullanıldı. Son olarak, bu miRNA'ların seviyeleri ile hedeflenen genlerin KEGG yolağı arasındaki potansiyel bir ilişki araştırılmıştır. miRNA'ların önemli ölçüde dahil olduğu yollar hakkında daha fazla bilgi edinmek için KEGG yolağı analizi kullanılmıştır. Bu çalışmadaki KEGG yol analizi, farklı şekilde ifade edilen miRNA'ların esas olarak kanser haritasındaki yollarda zenginleştiğini göstermiştir. Daha önce bahsedilen deneysel sertifikalı miRNA-hedef gen veritabanlarına dayanarak, miRNA-hedef gen düzenleyici ağı Network Analyst web aracı kullanılarak oluşturulmuştur. Bu çalışmada, KEGG zenginleştirme analizi, miR-4510 ve miR-146b-5p tarafından düzenlenen hedef genlerin esas olarak MAPK sinyal yolağı, kanser yolları gibi işlevlerde zenginleştiğini göstermiştir. MAPK sinyalinin,  $\beta$  büyüme faktörünün dönüşümüne yanıt olarak aktini yeniden şekillendirerek in vivo hücre invazyonunu ve tümör ilerlemesini teşvik ettiği gösterilmiştir (Daroqui et al., 2012). Tümör nekroz faktörünün p38 MAPK/mitojen ve stresle aktive olan

protein kinaz 1 sinyal yolu ile siklik adenosin monofosfat bağlayıcı protein yanıt elemanını aktive ettiği bulunmuştur (Gustin et al., 2004). MAPK sinyalizasyon ve kanser yolları HCC süreçleriyle yakından ilişkilidir ve bu nedenle MAPK sinyalizasyon yolu ve kanserle ilgili yollarla (KEGG analizi ile belirlendiği gibi) ilişkili olan farklı şekilde ifade edilen miRNA, HCC gelişiminde rol alabilir. Ayrıca, The Cancer Genome Atlas (TCGA) potansiyel miR-146b IRAK1 düzenlemesinin klasik PTC alt tipini karakterize ettiğini öne sürmüştür (Stokowy et al., 2016). HCC örneklerinde farklı eksprese edilen miRNA'lar, miRNA'nın karaciğer kanserindeki önemini araştırmak için ayrıca analiz edilmiştir. miRNA-hedefli gen ile ilgili in silico analizler TRAF6, TMEM167A ve TMPRS5 genleri hem miR-146b-5p hem de miR-4510 tarafından hedeflenmiştir. Her iki miRNA'yı da hedef alan bu üç genin ve ayrıca TMEM167A ve TMPRS5'in ilk kez aynı miRNA'ları tanımladığını bulduk. Ancak, bu veriler HCC gelişiminin anlaşılması için miR-146b-5p ve miR-4510 aracılı gen düzenlemesinin tanımlanması için çalışılmalıdır. Bu nedenle, bu genleri düzenleyen miRNA'lar HCC için önemli olabilir.

Bu nedenle, bir kan testinin daha az invazivliğini birleştirecek ve güvenilir bir erken teşhis yöntemi olarak hizmet edecek yeni belirteçlere ihtiyaç vardır. miRNA'lar kesinlikle bu potansiyele sahiptir çünkü sadece serum / plazmada tespit edilebilmeleri değil, aynı zamanda duyarlılıkları ve stabiliteleri klinik bir ortam için uygundur. Yönteme bağlı olarak, bir kopya kadar az bir miktar tespit edilebilir (Borel et al., 2012). Bununla birlikte, HCC'ye çoğunlukla viral enfeksiyon, siroz veya altta yatan diğer karaciğer rahatsızlıkları eşlik ettiğinden uygun kontroller kullanılmalıdır. Bu nedenle, bir miRNA'nın HCC'ye özgüllüğünü değerlendirmek için, yalnızca yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş bir kontrol grubu sağlamak değil, aynı zamanda altta yatan karaciğer hastalığının etiyojisi ve ciddiyeti açısından da eşleştirilmeleri kritik önem taşımaktadır. Bu nedenle dolaşımdaki miRNA'lar, şu anda kullanılan tümör belirteçlerinden daha iyi performans göstermeleri halinde HCC hastalarında ilk basamak test olarak kullanılabilir. Dolaşımdaki miRNA'ların keşfi ilginç klinik perspektifler sunmaktadır ancak bu araştırma alanı oldukça yenidir ve daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Hangi miRNA'nın hastalık gelişimi ve prognozun erken aşamalarında HCC varlığı ile hassas ve güvenilir bir şekilde ilişkilendirilebileceği henüz belirlenmemiştir.

HCC'de, birkaç miRNA'nın iki işlevi vardır. Tümör gelişimi ve ilerlemesi sırasında hem onkogen hem de tümör baskılayıcı genler olarak işlev görebilirler. Rollerini belirlemek için kesin ve hızlı kuralları yoktur. Bu durum, klinisyenlerin bu tür miRNA'ları yüksek ya da düşük miktarlarına bakmaksızın dikkatle izlemeleri gerektiği anlamına gelebilir. miRNA aracılı gen

düzenlemesinin önemli bir transkripsiyon sonrası mekanizma olarak tanımlanması, kanser genetiğini daha da karmaşık hale getirmektedir. Bununla birlikte, miRNA'ların büyüme ve tümörigenezi kontrol ettiği moleküler yolların anlaşılması, kanser teşhisi ve tedavisi için yepyeni fikirlerle sonuçlanabilir

Ayrıca, potansiyel bir öngörücü biyobelirteç sergilemek için, HBV-HCC'de miR-146b-5p ve miR-4510'un ifade düzeyi analizini gerçekleştirdik. Ekspresyon düzeyinin çeşitli alt gruplar (KHB, HBV-Siroz) arasındaki etkisinin tahmin edilmesi de bu miRNA'ların hepatoselüler karsinomdaki rolünü göstermektedir. Verilerimiz miR-146b-5p ekspresyonunun HBV-HCC grubunda diğer gruplara göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca, kontrol grubunda daha yüksek miR-146b-5p ekspresyonu gözlenmiştir. Bu arada, miR-146b-5p ekspresyonunu göstermek için bir in vivo çalışma ve sağlıklı örneklerle karşılaştırıldığında HCC örneklerinde hem miRNA'ların hedef genlerini hem de biyoinformatik bir çalışma gerçekleştirdik.

Çalışmamız, miRTarBase'den tahmin analizi yoluyla Mir skoru kullanarak miR-146b-5p ve TRAF6 ile miR-4510 ve RAF etkileşiminin anlaşılmasını genişletmektedir. Bununla birlikte, bazı çelişkili sonuçlar daha büyük ölçekli araştırmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır. Farklı kanser türlerinde hedef gen doğrulaması ve yol analizi gereksiz değildir. Yukarıda açıklanan sonuçlar, IRAK1, TRAF6 ve ... gibi bazı hedef genlerin miR-146b-5p aracılı düzenlenmesinin bazı durumlarda tümörigenezi desteklediğini, bazılarında ise engellediğini göstermektedir.

Diğer ilginç deneyler, miRNA'ların insan vücut sıvılarında tespit edilebildiğini, genellikle kanser hastalarından alınan sıvılarda sağlıklı bireylerden alınan sıvılara kıyasla farklı konsantrasyonlarda olduğunu göstermiştir. Bu seviyeler bazen kanser alt tipine ve metastaz durumuna bağlı olarak bile farklılık göstermektedir (Iacona & Lutz, 2019). Bu durum, miR-4510'un çalışmamızda neden yalnızca kontrol grubunda ifade edildiğini destekleyebilir.

miR-4510 ve miR-146b-5p'nin prediktif bir değeri vardır, prognostik değerlerine ulaşamadık.

Araştırma örneklemimiz büyük değildi, gelecekteki çalışmalar.

Klinik numune taramaları, kısmen numune alma sürecindeki (cerrahi veya biyopsi) teknik çeşitlilik, dondurma süresi ve yöntemi, RNA izolasyon yöntemi ve tespit yöntemi nedeniyle niteliksel olarak heterojendir. MiRNA taramalarının çoğunluğu miRNA RT-qPCR kullanılarak gerçekleştirilirken, bazı makaleler mikroarray ve NGS'yi de içermektedir. İkinci olarak, önemli bir varyans kaynağı hastalığın etiolojisidir. Veriler bir havuzda toplanırken bu durum göz

önünde bulundurulmalıdır çünkü hasta grubu tek bir etiyolojiye (alkol veya virüs) veya birden fazla etiyolojiye (alkol artı viral) sahip olabilir (Borel et al., 2012).

Üçüncü olarak, miRNA düzensizliklerinin erken bir aşamada gelişmeye başlamasına rağmen (P. Gao et al., 2011), miRNA ekspresyonunun hastalık ilerledikçe nasıl değiştiği belirsiz olduğundan, hastalığın evresini dikkate almak önemlidir. Normalizasyon için kullanılan kontrol dokusu, farklı bir patolojisi olan veya bilinen bir patolojisi olmayan hastalardan alınan sağlıklı karaciğer veya aynı hastadan alınan, yani altta yatan aynı karaciğer hastalığına (örn. siroz, viral enfeksiyon) sahip tümöral olmayan karaciğer dokusu olabilir, ayrıca önemlidir (Borel et al., 2012). Bu son seçenek, yalnızca birey içi değişikliklerin incelenmesine olanak tanır. Bununla birlikte, birkaç önemli miRNA'nın düzensizliği çeşitli taramalarda mevcut gibi görünmektedir.

Çalışmamızın in-siliko kısmında dokuda miR-146b-5p'nin arttığı ancak in vivo kısımda serumda miR-146b-5p ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi ki bu da çalışmamızı destekleyen bir kanıttır. HBV'ye bağlı HCC'de doku ve serumda miR-146b-5p'nin farklı düzeylerde

Diğer kanser türlerine sahip hastalarda da miR-146b'nin serum konsantrasyonları incelenmiştir. MiR-146b'nin serum seviyeleri, özofagus skuamöz hücreli kanserden muzdarip hastalarda sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur (Wang, Guan ve diğerleri, 2016). Metastazla ilişkili akciğer adenokarsinomu transkript 1 (MALAT1) uzun kodlayıcı olmayan RNA, HCC dokularında tümör komşu dokulara göre daha yüksek bulunmuş ve MALAT1 ile miR-146b-5p arasında tamamlayıcı bir dizi ve bu ikisi arasında negatif bir ilişki tespit edilmiştir. Bu bulgular MALAT1'i miR-146b-5p'nin moleküler bir sponge(sünger) olarak tanımladı ve bu, miR-146b-5p ekspresyonunun HCC'de neden daha düşük olduğunu açıklayabilir (Li, Miao, et al. 2017). Yukarıdaki sonuçların tümü, HCC'de miR-146b-5p ekspresyonunun azalmasının olumsuz bir faktör olduğunu ve hücre büyümesinin bozulmasına ve metastaza yol açabileceğini göstermektedir (Li, Miao, et al. 2017).

Bizde potansiyel bir prediktif biyobelirteç olabileceklerini belirlemek için miR-146b-5p ve miR-4510'un HBV-HCC'de hastalığın çeşitli alt gruplarında (CHB, HBV-cirrhosis) ekspresyon seviyesi analizini gerçekleştirdik. Bu şekilde bu miRNA'ların hepatosellüler karsinomdaki rolünü gösterdik. Çalışmamızda, verilerimiz miR-146b-5p ekspresyonunun HBV-HCC grubunda diğer gruplara göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca kontrol grubunda daha yüksek miR-146b-5p ekspresyonu gözlemlendi. Bu bir in vivo çalışmanın yanı sıra, miR-146b-5p ekspresyonunu göstermek için HCC örneklerinde her iki miRNA'nın hedef genlerinin biyoinformatik bir analiz gerçekleştirdik. Çalışmamızda ilk kez mir-146b-5p

ekspresyonu HBV-HCC gruplarında diğerlerine göre serumda anlamlı derecede azalmış olarak keşfedilmiştir.

HCC tümörlerinde önemli ölçüde azalmış olan MiR-4510, HCC hücrelerinde proliferasyonun durmasına ve apoptoza neden olan glipikan-3 (GPC3) ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Jalvy-Delvaille, Maurel, ve diğerleri 2012, Maurel, Jalvy, ve diğerleri. 2013, Cartier, Indersie, ve ark. 2017) (Zynger, Gupta, et al. 2008, Hoshida, Nijman, et al. 2009), bu çalışma serumda ekspresyonunu neden gösteremediğimizi açıklayabilir. Çünkü tümördeki ekspresyonu azken seruma salınımı da yok denecek kadar az olabilir. Ek olarak, komşu normal dokulara kıyasla Gastrointestinal tümör(GIST)'lerde de miR-4510 ekspresyonu azalmıştır. MiR-4510'un aşırı ekspresyonu, apolipoprotein C-II'yi (APOC2) hedefleyerek GIST-882 hücre çoğalmasını, göçünü ve istilasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, miR-4510'un Aşırı ekspresyonunun ayrıca AKT ve ERK1 / 2'nin fosforilasyonunu inhibe ettiğini ve matris metalopeptidaz 2 (MMP2) ve MMP9'un ekspresyonunu azalttığını göstermiştir (Chen, Qin, ve diğerleri. 2020).

Mevcut çalışmada, sağlıklı serumlara kıyasla HBV-HCC hasta serumlarında, HBV-Siroz hastalarının serumlarında ve KHB hastalarının serumlarında miR-146b'nin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Yaptığımız in-silico analizde de TGCA-LIHC tümör dokusunda MiR-146b'nin ekspresyonunun, bitişik normal karaciğer dokularına kıyasla arttığı gözlenmiştir. Çalışmamız literatürde ilk olarak miRNA-146-5p serum ekspresyon seviyesinin HCC'de anlamlı derecede düşük olduğunu göstermiştir. Ancak miRNA-4510, tüm çalışma gruplarında serumda karşılaştırılabilir bir düzeyde saptanamamıştır. MiR-4510, kontrol grubunda sadece üç kişide bulunduğu için kalitatif bir kriter olarak kabul edilip, Hepatit B virüsü tarafından enfeksiyondan sonra ekspresyonu azalmış ya da baskılanmış olduğu düşünülmüştür. Bizim çalışmamızla tutarlı olarak başka çalışmalarda da insan vücut sıvılarında, sağlıklı bireylerden alınan sıvılara kıyasla kanser hastalarından alınan sıvılarda genellikle farklı konsantrasyonlarda miRNA'ların tespit edilebileceğini gösterilmiştir. Bu seviyeler bazen kanser alt tipine ve metastaz durumuna göre farklılık gösterdiği bulunmuştur (Iacona ve Lutz 2019). Bu, miR-4510'un çalışmamızda neden sadece kontrol grubunda ifade edildiğini destekleyebilir.

Çoklu araştırma çalışmalarının değerlendirilmesi, miRNA'ların protein kodlayan genlerin büyük çoğunluğunu doğrudan etkileyebileceği sonucuna varmıştır. MiRNA fonksiyonlarını ve bunların hastalık gelişimi üzerindeki sonuçlarını anlamak, miRNA hedeflerinin tanımlanmasını gerektirir. MiRNA'lar ve hedef genleri arasındaki feedback mekanizmasının kontrolü, HCC'nin gelişimi için çok önemlidir. Tek bir miRNA, HCC fenotipinin oluşumunda ve

korunmasında yer alan birçok geni hedefleyebilir. Bununla birlikte, miRNA'ların hedef genleri ile ilişkisi ve bu ilişkilerin HCC gelişimi üzerindeki etkisi nadiren araştırılmaktadır.

Mir 146b 5p'nin ekspresyon seviyesi, prostat kanseri, pankreas kanseri ve glioblastoma gibi solid tümörlerde sıklıkla azalmıştır (Li, Wang ve ark. 2013). HCC ile ilgili miRNA'ların analizi çalışması, miR-146b-5p'nin HCC'yi düzenleyen en çok sayıda hedef gene sahip olduğunu ortaya çıkardı. Bu nedenle miR-146b-5p'nin HCC'nin ilerlemesinde önemli roller üstlenebileceği ve belki de HCC'nin tanısı için yeni bir biyobelirteç olabileceği önerilmiştir (Ding, Yang, ve ark. 2017). Ancak, bu çalışmanın deneysel doğrulama eksikliği ve ekspresyon profili verilerinin ortak analizi gibi sınırlamaları vardır. Ancak bizim verilerimiz, miR-146b-5p ifadesinin deneysel doğrulamasını ve analizini sağlar, bu sayede literatürdeki eksiklik giderilmiş oldu.

Rapor edilen çalışmaların çoğu, IRAK1 ve TRAF6'yı miR-146 ailesinin ana hedefleri olarak tanımlamıştır. Ayrıca, miR-146b-5p ve TRAF6 mRNA arasındaki karşılıklı etkileşim, miRNA-mRNA çiftli bağı arasındaki güçlü bağlanma enerjisini doğrulamıştır (Paterson ve Kriegel 2017). Bu kanıt, TRAF6'nun HCC'de miR-146b-5p'nin doğrudan hedef geni olduğunu gösterebilir. Bu nedenle, miR-146b-5p'nin işlevi ve hepatosellüler kanserdeki hedefi olan TRAF6'nun daha fazla karakterizasyon ve doğrulamaya ihtiyacı vardır. Ayrıca, bu tahminler, gelecekte deneysel doğrulamaya dayalı mekanik rollerini anlayarak doğrulanmalıdır. MiR-146b-5p, hesaplamalı klinik araştırmalarla HBV-HCC için prediktif bir biyobelirteç olabilir.

MiR-146b-5p ekspresyonunun dört HCC hücre hattında (MHCC97-H, SMMC-7721, Hep3B ve HepG2) ve bir insan ölümsüz karaciğer hücre hattında (LO2) azaldığı gösterilmiştir. MiR-146b-5p yıkımının Hep3B hücrelerinde p-Akt ekspresyonunu arttırdığı, miR-146b-5p aşırı ekspresyonunun ise MHCC97-H hücrelerinde p-Akt ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Li, Miao ve ark. 2017). TRAF6 aşırı ekspresyonu, tümörjenez ve tümör gelişimi ile yakından ilişkilidir. TRAF6, kanserde yer alan farklı sinyal yollarını etkiler ve tümör hücresi proliferasyonunu, hayatta kalma apoptozunu ve istilasını düzenler. TCGA ve GEO'dan alınan istatistiklere göre, TRAF6'nun yüksek ekspresyonu, TRAF6'nun düşük ekspresyonu ile karşılaştırıldığında kötü prognoz ile önemli ölçüde ilişkilidir (Li, Liu ve diğerleri. 2020). Bizim çalışmamızda da yukarıda bahsedilen çalışmalarla benzer sonuçlar bulduk.

miRNA'lar birçok farklı kanserde düzensizdir ve yaygın laboratuvar teknikleriyle doğru bir şekilde tespit edilebilir. Bizim çalışmamızda biyomarker olarak araştırdığımız bir miR-4510 kalitatif bir belirteç olarak düşünüldü çünkü sadece kontrol grubunda 3 bireyde ekspresyonuna

rastlandı. Ancak grubun toplam birey sayısı kısıtlı olduğu için tam popülasyonun güven aralığını sağlamayabilir.

Çalışmada araştırılan ikinci mikro RNA miR-146b-5p'ydı. Bu çalışmada, miR-146b-5p'nin HSK için tanısal bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini gösterdik. Birkaç çalışma miR-146b-5p'nin erken evre HSK için invaziv olmayan bir tanısal biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini bildirmiş olsa da HSK hastaları ile hastalığın prognozunu da dahil edilebilecek siroz aşaması ve diğer alt gruplar araştırılmamıştır. Daha önceki yapılan bir çalışmada miR-146b-5p'nin HSK dokularında ekspresyonunun azaldığını ve kötü prognoz ile korele olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmadan in vitro ve in vivo deneyler, miR-146b-5p'nin proliferasyonu, göçü ve istilayı baskılayabildiğini ve TRAF6/p-Akt sinyal yolunu inhibe ederek apoptozu indükleyebildiğini göstermiştir.

Özetle, serum miR-146b-5p' nin düzeylerinin HCC için invaziv olmayan bir tanısal biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini ve miR-146b-5p düzeylerinin HCC prognozu için öngörücü bir biyobelirteç olabileceğini gösterdik. Ancak çalışmamızın örneklem büyüklüğü yeterince büyük olmayabilir ve daha fazla örnekleme dahil edilmelidir.

Birlikte ele alındığında lncRNA GAS5, bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür ve potansiyel bir tedavi hedefi veya prognoz belirleyicisi olmayı vaat eder. GAS5'in ekspresyonunun azalmasının mekanizması ve sinyal yolu daha fazla araştırmayı hak ediyor.

Biyoinformatik araçlarındaki inanılmaz gelişmeler, kanser araştırmaları alanında kodlama yapan ve yapmayan transkriptlerle ilgili devasa veriler üretmektedir. Kodlayan ve kodlamayan RNA'ların karmaşık gen düzenleme ağındaki moleküler etkileşimi tam olarak çözülememiştir.

Transkriptomik analiz yöntemleri, tüm genom düzeyinde mRNA ekspresyon değişikliklerini değerlendirmeye imkân vermeleri sebebiyle biyobelirteç taramalarında sıklıkla tercih edilen yöntemlerdir. Fakat, RNA ekspresyonunu etkileyen birçok demografik, klinik, deneysel ve çevresel faktör bulunmaktadır. Transkriptomik araştırmalar sonucunda elde edilen verilerin hastalık ile direkt olarak ilişkilendirilebilmesi için bu faktörlerin minimuma indirilmesi gerekmektedir.

HBV-ilişkili HCC hastalarına ilişkin transkriptomik veri oldukça kısıtlı olup, bu araştırmaların birçoğunda tümörlerin derecelendirmesi yapılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada tümörlerin dereceleri dikkate alınmadan, tüm tümör dokuları, eşlenik komşu dokular ile karşılaştırılmıştır. Hasta grubuna ait veriler kısıtlı olduğundan çalışma sonucunda elde edilen veriler bir diğer

HBV-ilişkili HCC hasta grubunda valide edilememiştir. Araştırma sonucunda elde edilen verilerin ileri araştırmalarda valide edilmesi gerekmektedir.

Bugüne kadar, lncRNA' lar biyolojinin hemen her alanında temel bir düzenleyici olarak ortaya çıkmıştır. LncRNA' nın fonksiyonel rolünün anlaşılmasındaki hızlı artışa rağmen, bu alan henüz emekleme aşamasındadır. İnsan hastalıklarındaki rolleri hala bir sırdır. LncRNA' ların çoğunun genomik ve transkriptomik yaklaşımlarla tanımlanmış çeşitli işlevlere sahip olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, lncRNA' ların gen ekspresyonunun önemli düzenleyicileri olduğu açıktır ve lncRNA' ların hücrel ve gelişimsel süreçlerde geniş bir fonksiyon aralığına sahip olduğu düşünülmektedir. LncRNA' lar miRNA, mRNA, protein veya bunların kombinasyonu ile karmaşık etkileşime yönelik bir platform olarak işlev görürler. LncRNA' ların yanlış sentezlenmesi, tümör başlangıcı, büyüme ve metastaz için kanser hücresi kapasitelerini verir. LncRNA' lar kanser ve çeşitli hastalıkların teşhisi ve tedavisi için umut verici bir hedef olarak hizmet eder.

Gelecekteki lncRNA çalışmalarının genomumuzdaki rolünü tam olarak anlamak için gerekli olması gerekmektedir. Gelecekte; lncRNA fonksiyonlarını nedensel olarak göstermek için büyük ölçekli fonksiyon kaybı veya fonksiyon kazancı çalışmalarına ihtiyaç vardır. In vivo lncRNA' ların işlevini anlamak için genetik model sistemlerinin geliştirilmesine açık bir ihtiyaç vardır. ASO (antisense oligo nükleotid)' lerin kullanımı, siRNA, terapötik amaç için hastalıklarla ilişkili lncRNA' ları hedeflemek için kullanılabilir. Genom içinde belirli bölgeler için yeni epigenetik müdahale araçları olarak hareket ettirilebilirler.

## 8. KAYNAKLAR

- (WHO), W. H. O. (2020). *Hepatitis B 3rd dose (HepB3) immunization coverage*. Retrieved 26.10.2023 from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>
- Abou-Alfa, G. K., Meyer, T., Cheng, A. L., El-Khoueiry, A. B., Rimassa, L., Ryoo, B. Y., Cicin, I., Merle, P., Chen, Y., Park, J. W., Blanc, J. F., Bolondi, L., Klumpen, H. J., Chan, S. L., Zagonel, V., Pressiani, T., Ryu, M. H., Venook, A. P., Hessel, C., Borgman-Hagey, A. E., Schwab, G., & Kelley, R. K. (2018). Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*, 379(1), 54-63. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1717002>
- Akkiz, H., Carr, B. I., Yalçın, K. K., Guerra, V., Kuran, S., Altıntaş, E., Üsküdar, O., Karaoğullarından, Ü., Özakyol, A., Tokmak, S., Yücesoy, M., Bahçeci, H., Ülkü, A., Akçam, T., Yalçın Polat, K., Ekin, N., Şimşek, H., Örmeci, N., Sonsuz, A., Demir, M., Kılıç, M., Uygun, A., Ballı, T., Demir, A., Arslan, B., & Doran, F. (2018). Characteristics of Hepatocellular Carcinoma Aggressiveness Factors in Turkish Patients. *Oncology*, 94(2), 116-124. <https://doi.org/10.1159/000484564>
- Altay, T., Uskun, E., & Akcam, F. Z. (2012). Seroprevalence of hepatitis B surface antigen and its correlation with risk factors among new recruits in Turkey. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 339-344.
- An, W. (2007). Histone acetylation and methylation: combinatorial players for transcriptional regulation. *Subcell Biochem*, 41, 351-369.
- Aravalli, R. N., Steer, C. J., & Cressman, E. N. (2008). Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 48(6), 2047-2063. <https://doi.org/10.1002/hep.22580>
- Asafo-Agyei, K. O., & Samant, H. (2023). Hepatocellular Carcinoma. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.
- Backes, C., Meese, E., Lenhof, H. P., & Keller, A. (2010). A dictionary on microRNAs and their putative target pathways. *Nucleic Acids Res*, 38(13), 4476-4486. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq167>
- Balogh, J., & Victor, D. (2016). rd, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, et al. *Hepatocellular carcinoma: A review. J Hepatocell Carcinoma*, 3, 41-53.
- Bartha, Á., & Györffy, B. (2021). TNMplot. com: a web tool for the comparison of gene expression in normal, tumor and metastatic tissues. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2622.
- Bassaganyas, L., Pinyol, R., Esteban-Fabrá, R., Torrens, L., Torrecilla, S., Willoughby, C. E., Franch-Expósito, S., Vila-Casadesús, M., Salaverria, I., Montal, R., Mazzaferro, V., Camps, J., Sia, D., & Llovet, J. M. (2020). Copy-Number Alteration Burden Differentially Impacts Immune Profiles and Molecular Features of Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 26(23), 6350-6361. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-20-1497>

- Bayard, Q., Meunier, L., Peneau, C., Renault, V., Shinde, J., Nault, J. C., Mami, I., Couchy, G., Amaddeo, G., Tubacher, E., Bacq, D., Meyer, V., La Bella, T., Debaillon-Vesque, A., Bioulac-Sage, P., Seror, O., Blanc, J. F., Calderaro, J., Deleuze, J. F., Imbeaud, S., Zucman-Rossi, J., & Letouzé, E. (2018). Cyclin A2/E1 activation defines a hepatocellular carcinoma subclass with a rearrangement signature of replication stress. *Nat Commun*, 9(1), 5235. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07552-9>
- Bhaumik, D., Scott, G. K., Schokrpur, S., Patil, C. K., Orjalo, A. V., Rodier, F., Lithgow, G. J., & Campisi, J. (2009). MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging (Albany NY)*, 1(4), 402-411. <https://doi.org/10.18632/aging.100042>
- Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D. C., & Roudot-Thoraval, F. (2013). The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*, 58(3), 593-608. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.005>
- Blaya, D., Pose, E., Coll, M., Lozano, J. J., Graupera, I., Schierwagen, R., Jansen, C., Castro, P., Fernandez, S., Sidorova, J., Vasa-Nicotera, M., Solà, E., Caballería, J., Trebicka, J., Ginès, P., & Sancho-Bru, P. (2021). Profiling circulating microRNAs in patients with cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *JHEP Rep*, 3(2), 100233. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100233>
- Borel, F., Konstantinova, P., & Jansen, P. L. (2012). Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 56(6), 1371-1383. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.11.026>
- Bosch, F. X., Ribes, J., Cléries, R., & Díaz, M. (2005). Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*, 9(2), 191-211, v. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2004.12.009>
- Boyault, S., Rickman, D. S., de Reyniès, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., Hérault, A., Saric, J., Belghiti, J., Franco, D., Bioulac-Sage, P., Laurent-Puig, P., & Zucman-Rossi, J. (2007). Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, 45(1), 42-52. <https://doi.org/10.1002/hep.21467>
- Bozgeyik, E., Igci, Y. Z., Jacksi, M., Arman, K., Gurses, S., Bozgeyik, I., Pala, E., Yumrutas, O., Temiz, E., & Igci, M. (2016). A novel variable exonic region and differential expression of LINC00663 non-coding RNA in various cancer cell lines and normal human tissue samples. *Tumor Biology*, 37. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4782-3>
- Braconi, C., Henry, J. C., Kogure, T., Schmittgen, T., & Patel, T. (2011). The role of microRNAs in human liver cancers. *Semin Oncol*, 38(6), 752-763. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2011.08.001>
- Braconi, C., Kogure, T., Valeri, N., Huang, N., Nuovo, G., Costinean, S., Negrini, M., Miotto, E., Croce, C. M., & Patel, T. (2011). microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer. *Oncogene*, 30(47), 4750-4756. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.193>
- Braconi, C., Valeri, N., Kogure, T., Gasparini, P., Huang, N., Nuovo, G. J., Terracciano, L., Croce, C. M., & Patel, T. (2011). Expression and functional role of a transcribed noncoding RNA with an ultraconserved element in hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(2), 786-791. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011098108>

- Braghini, M. R., Lo Re, O., Romito, I., Fernandez-Barrena, M. G., Barbaro, B., Pomella, S., Rota, R., Vinciguerra, M., Avila, M. A., & Alisi, A. (2022). Epigenetic remodelling in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, *41*(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02297-2>
- Bréchet, C., Gozuacik, D., Murakami, Y., & Paterlini-Bréchet, P. (2000). Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Seminars in cancer biology*,
- Bronevetsky, Y., & Ansel, K. M. (2013). Regulation of miRNA biogenesis and turnover in the immune system. *Immunol Rev*, *253*(1), 304-316. <https://doi.org/10.1111/imr.12059>
- Bruix, J., Qin, S., Merle, P., Granito, A., Huang, Y. H., Bodoky, G., Pracht, M., Yokosuka, O., Rosmorduc, O., Breder, V., Gerolami, R., Masi, G., Ross, P. J., Song, T., Bronowicki, J. P., Ollivier-Hourmand, I., Kudo, M., Cheng, A. L., Llovet, J. M., Finn, R. S., LeBerre, M. A., Baumhauer, A., Meinhardt, G., & Han, G. (2017). Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, *389*(10064), 56-66. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)32453-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32453-9)
- Bruix, J., & Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*, *53*(3), 1020-1022. <https://doi.org/10.1002/hep.24199>
- Bruix, J., Takayama, T., Mazzaferro, V., Chau, G. Y., Yang, J., Kudo, M., Cai, J., Poon, R. T., Han, K. H., Tak, W. Y., Lee, H. C., Song, T., Roayaie, S., Bolondi, L., Lee, K. S., Makuuchi, M., Souza, F., Berre, M. A., Meinhardt, G., & Llovet, J. M. (2015). Adjuvant sorafenib for hepatocellular carcinoma after resection or ablation (STORM): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*, *16*(13), 1344-1354. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(15\)00198-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(15)00198-9)
- Bruno, S., Crosignani, A., Maisonneuve, P., Rossi, S., Silini, E., & Mondelli, M. U. (2007). Hepatitis C virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study. *Hepatology*, *46*(5), 1350-1356. <https://doi.org/10.1002/hep.21826>
- Budhu, A., Jia, H. L., Forgues, M., Liu, C. G., Goldstein, D., Lam, A., Zanetti, K. A., Ye, Q. H., Qin, L. X., & Croce, C. M. (2008). Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *47*(3), 897-907.
- Cao, M.-Q., You, A.-B., Zhu, X.-D., Zhang, W., Zhang, Y.-Y., Zhang, S.-Z., Zhang, K.-w., Cai, H., Shi, W.-K., & Li, X.-L. (2018). miR-182-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by repressing FOXO3a. *Journal of hematology & oncology*, *11*(1), 1-12.
- Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W., & Leal, J. F. (2008). The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*, *8*(3), 187-198. <https://doi.org/10.2174/156800908784293659>
- Cartier, F., Indersie, E., Lesjean, S., Charpentier, J., Hooks, K. B., Ghousein, A., Desplat, A., Dugot-Senant, N., Trézéguet, V., & Sagliocco, F. (2017). New tumor suppressor microRNAs target glypican-3 in human liver cancer. *Oncotarget*, *8*(25), 41211.
- Chan, S. L., Mo, F., Johnson, P. J., Siu, D. Y., Chan, M. H., Lau, W. Y., Lai, P. B., Lam, C. W., Yeo, W., & Yu, S. C. (2014). Performance of serum  $\alpha$ -fetoprotein levels in the

- diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with a hepatic mass. *HPB (Oxford)*, 16(4), 366-372. <https://doi.org/10.1111/hpb.12146>
- Chandrashekar, D. S., Bashel, B., Balasubramanya, S. A. H., Creighton, C. J., Ponce-Rodriguez, I., Chakravarthi, B., & Varambally, S. (2017). UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*, 19(8), 649-658. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>
- Chandrashekar, D. S., Karthikeyan, S. K., Korla, P. K., Patel, H., Shovon, A. R., Athar, M., Netto, G. J., Qin, Z. S., Kumar, S., Manne, U., Creighton, C. J., & Varambally, S. (2022). UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*, 25, 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.01.001>
- Chang, L., Li, C., Lan, T., Wu, L., Yuan, Y., Liu, Q., & Liu, Z. (2016). Decreased expression of long non-coding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by regulating vimentin. *Mol Med Rep*, 13(2), 1541-1550. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4716>
- Chang, M. H., Chen, C. J., Lai, M. S., Hsu, H. M., Wu, T. C., Kong, M. S., Liang, D. C., Shau, W. Y., & Chen, D. S. (1997). Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med*, 336(26), 1855-1859. <https://doi.org/10.1056/nejm199706263362602>
- Chen, C. J., Yang, H. I., Su, J., Jen, C. L., You, S. L., Lu, S. N., Huang, G. T., & Iloeje, U. H. (2006). Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *Jama*, 295(1), 65-73. <https://doi.org/10.1001/jama.295.1.65>
- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 303(5654), 83-86. <https://doi.org/10.1126/science.1091903>
- Chen, F., Li, Y., Li, M., & Wang, L. (2019). Long noncoding RNA GAS5 inhibits metastasis by targeting miR-182/ANGPTL1 in hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res*, 9(1), 108-121.
- Chen, I. P., Ariizumi, S., Nakano, M., & Yamamoto, M. (2014). Positive glypican-3 expression in early hepatocellular carcinoma predicts recurrence after hepatectomy. *J Gastroenterol*, 49(1), 117-125. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0793-2>
- Chen, P. J., Furuse, J., Han, K. H., Hsu, C., Lim, H. Y., Moon, H., Qin, S., Ye, S. L., Yeoh, E. M., & Yeo, W. (2010). Issues and controversies of hepatocellular carcinoma-targeted therapy clinical trials in Asia: experts' opinion. *Liver International*, 30(10), 1427-1438.
- Chen, Y., Qin, C., Cui, X., Geng, W., Xian, G., & Wang, Z. (2020). miR-4510 acts as a tumor suppressor in gastrointestinal stromal tumor by targeting APOC2. *Journal of Cellular Physiology*, 235(7-8), 5711-5721.
- Cheng, A. L., Kang, Y. K., Chen, Z., Tsao, C. J., Qin, S., Kim, J. S., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, T. S., Xu, J., Sun, Y., Liang, H., Liu, J., Wang, J., Tak, W. Y., Pan, H., Burock, K., Zou, J., Voliotis, D., & Guan, Z. (2009). Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III

- randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*, 10(1), 25-34. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(08\)70285-7](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(08)70285-7)
- Chi, Y., & Zhou, D. (2016). MicroRNAs in colorectal carcinoma-from pathogenesis to therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 1-11.
- Chiang, D. Y., Villanueva, A., Hoshida, Y., Peix, J., Newell, P., Minguez, B., LeBlanc, A. C., Donovan, D. J., Thung, S. N., Solé, M., Tovar, V., Alsinet, C., Ramos, A. H., Barretina, J., Roayaie, S., Schwartz, M., Waxman, S., Bruix, J., Mazzaferro, V., Ligon, A. H., Najfeld, V., Friedman, S. L., Sellers, W. R., Meyerson, M., & Llovet, J. M. (2008). Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 68(16), 6779-6788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-08-0742>
- Chidambaranathan-Reghupaty, S., Fisher, P. B., & Sarkar, D. (2021). Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. *Adv Cancer Res*, 149, 1-61. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.10.001>
- Chimed, T., Sandagdorj, T., Znaor, A., Laversanne, M., Tseveen, B., Genden, P., & Bray, F. (2017). Cancer incidence and cancer control in Mongolia: Results from the National Cancer Registry 2008-12. *Int J Cancer*, 140(2), 302-309. <https://doi.org/10.1002/ijc.30463>
- Clark, M. B., & Mattick, J. S. (2011). Long noncoding RNAs in cell biology. *Semin Cell Dev Biol*, 22(4), 366-376. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.01.001>
- Claudon, M., Dietrich, C. F., Choi, B. I., Cosgrove, D. O., Kudo, M., Nolsøe, C. P., Piscaglia, F., Wilson, S. R., Barr, R. G., Chammas, M. C., Chaubal, N. G., Chen, M. H., Clevert, D. A., Correas, J. M., Ding, H., Forsberg, F., Fowlkes, J. B., Gibson, R. N., Goldberg, B. B., Lassau, N., Leen, E. L., Mattrey, R. F., Moriyasu, F., Solbiati, L., Weskott, H. P., & Xu, H. X. (2013). Guidelines and good clinical practice recommendations for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) in the liver - update 2012: A WFUMB-EFSUMB initiative in cooperation with representatives of AFSUMB, AIUM, ASUM, FLAUS and ICUS. *Ultrasound Med Biol*, 39(2), 187-210. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2012.09.002>
- Couri, T., & Pillai, A. (2019). Goals and targets for personalized therapy for HCC. *Hepatol Int*, 13(2), 125-137. <https://doi.org/10.1007/s12072-018-9919-1>
- Crissien, A. M., & Frenette, C. (2014). Current management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 10(3), 153-161.
- D'Amico, G., Garcia-Tsao, G., & Pagliaro, L. (2006). Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol*, 44(1), 217-231. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.10.013>
- D'Onofrio, M., Faccioli, N., Zamboni, G., Malagò, R., Caffarri, S., Fattovich, G., & Mucelli, R. P. (2008). Focal liver lesions in cirrhosis: value of contrast-enhanced ultrasonography compared with Doppler ultrasound and alpha-fetoprotein levels. *Radiol Med*, 113(7), 978-991. <https://doi.org/10.1007/s11547-008-0316-z>
- Dahm, R. (2008). Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human genetics*, 122(6), 565-581.

- Dalerba, P., Cho, R. W., & Clarke, M. F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*, 58, 267-284. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.58.062105.204854>
- Daroqui, M. C., Vazquez, P., Bal de Kier Joffé, E., Bakin, A. V., & Puricelli, L. I. (2012). TGF- $\beta$  autocrine pathway and MAPK signaling promote cell invasiveness and in vivo mammary adenocarcinoma tumor progression. *Oncology reports*, 28(2), 567-575.
- De Minicis, S., Kisseleva, T., Francis, H., Baroni, G. S., Benedetti, A., Brenner, D., Alvaro, D., Alpini, G., & Marziani, M. (2013). Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Dig Liver Dis*, 45(6), 450-459. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2012.10.008>
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J. B., Lipovich, L., Gonzalez, J. M., Thomas, M., Davis, C. A., Shiekhattar, R., Gingeras, T. R., Hubbard, T. J., Notredame, C., Harrow, J., & Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 22(9), 1775-1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
- Diederichs, S. (2010). Nichtcodierende RNA in malignen Tumoren. *Der Pathologe*, 31(2), 258-262.
- Ding, J., Huang, S., Wu, S., Zhao, Y., Liang, L., Yan, M., Ge, C., Yao, J., Chen, T., Wan, D., Wang, H., Gu, J., Yao, M., Li, J., Tu, H., & He, X. (2010). Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI. *Nat Cell Biol*, 12(4), 390-399. <https://doi.org/10.1038/ncb2039>
- Ding, W., Yang, H., Gong, S., Shi, W., Xiao, J., Gu, J., Wang, Y., & He, B. (2017). Candidate miRNAs and pathogenesis investigation for hepatocellular carcinoma based on bioinformatics analysis. *Oncology Letters*, 13(5), 3409-3414.
- Doudna, J. A., & Batey, R. T. (2004). Structural insights into the signal recognition particle. *Annual review of biochemistry*, 73(1), 539-557.
- Duan, R., Li, C., Wang, F., Han, F., & Zhu, L. (2020). The Long Noncoding RNA ZFAS1 Potentiates the Development of Hepatocellular Carcinoma via the microRNA-624/MDK/ERK/JNK/P38 Signaling Pathway. *Onco Targets Ther*, 13, 4431-4444. <https://doi.org/10.2147/ott.S246278>
- EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. (2012). *J Hepatol*, 56(4), 908-943. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001>
- Eddy, S. R. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet*, 2(12), 919-929. <https://doi.org/10.1038/35103511>
- El-Khoueiry, A. B., Sangro, B., Yau, T., Crocenzi, T. S., Kudo, M., Hsu, C., Kim, T. Y., Choo, S. P., Trojan, J., Welling, T. H. R., Meyer, T., Kang, Y. K., Yeo, W., Chopra, A., Anderson, J., Dela Cruz, C., Lang, L., Neely, J., Tang, H., Dastani, H. B., & Melero, I. (2017). Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*, 389(10088), 2492-2502. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31046-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31046-2)

- El-Serag, H. B., Marrero, J. A., Rudolph, L., & Reddy, K. R. (2008). Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *134*(6), 1752-1763.
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, *132*(7), 2557-2576. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061>
- Elsayes, K. M., Hooker, J. C., Agrons, M. M., Kielar, A. Z., Tang, A., Fowler, K. J., Chernyak, V., Bashir, M. R., Kono, Y., Do, R. K., Mitchell, D. G., Kamaya, A., Hecht, E. M., & Sirlin, C. B. (2017). 2017 Version of LI-RADS for CT and MR Imaging: An Update. *Radiographics*, *37*(7), 1994-2017. <https://doi.org/10.1148/rg.2017170098>
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, *12*(12), 861-874. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>
- Faghihi, M. A., Modarresi, F., Khalil, A. M., Wood, D. E., Sahagan, B. G., Morgan, T. E., Finch, C. E., St Laurent, G., 3rd, Kenny, P. J., & Wahlestedt, C. (2008). Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med*, *14*(7), 723-730. <https://doi.org/10.1038/nm1784>
- Fan, G., Tu, Y., Chen, C., Sun, H., Wan, C., & Cai, X. (2018). DNA methylation biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int*, *18*, 140. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0629-5>
- Faranda, T., Grossi, I., Manganelli, M., Marchina, E., Baiocchi, G., Portolani, N., Crosatti, M., De Petro, G., & Salvi, A. (2019). Differential expression profiling of long non-coding RNA GAS5 and miR-126-3p in human cancer cells in response to sorafenib. *Sci Rep*, *9*(1), 9118. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45604-2>
- Fattovich, G., Giustina, G., Christensen, E., Pantalena, M., Zagni, I., Realdi, G., & Schalm, S. W. (2000). Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut*, *46*(3), 420-426. <https://doi.org/10.1136/gut.46.3.420>
- Feo, F., & Pascale, R. M. (2015). Multifocal hepatocellular carcinoma: intrahepatic metastasis or multicentric carcinogenesis? *Ann Transl Med*, *3*(1), 4. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.12.08>
- Ferlay J, E. M., Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. International Agency for Research on Cancer. Retrieved 24.10.2023 from <https://gco.iarc.fr/today>
- Fleischhacker, M., & Schmidt, B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1775*(1), 181-232.
- Florio, A. A., Ferlay, J., Znaor, A., Ruggieri, D., Alvarez, C. S., Laversanne, M., Bray, F., McGlynn, K. A., & Petrick, J. L. (2020). Global trends in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma incidence from 1993 to 2012. *Cancer*, *126*(11), 2666-2678. <https://doi.org/10.1002/cncr.32803>
- Forner, A., Reig, M., & Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, *391*(10127), 1301-1314. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)30010-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)30010-2)

- Frankish, A., Diekhans, M., Ferreira, A. M., Johnson, R., Jungreis, I., Loveland, J., Mudge, J. M., Sisu, C., Wright, J., Armstrong, J., Barnes, I., Berry, A., Bignell, A., Carbonell Sala, S., Chrast, J., Cunningham, F., Di Domenico, T., Donaldson, S., Fiddes, I. T., García Girón, C., Gonzalez, J. M., Grego, T., Hardy, M., Hourlier, T., Hunt, T., Izuogu, O. G., Lagarde, J., Martin, F. J., Martínez, L., Mohanan, S., Muir, P., Navarro, F. C. P., Parker, A., Pei, B., Pozo, F., Ruffier, M., Schmitt, B. M., Stapleton, E., Suner, M. M., Sycheva, I., Uszczynska-Ratajczak, B., Xu, J., Yates, A., Zerbino, D., Zhang, Y., Aken, B., Choudhary, J. S., Gerstein, M., Guigó, R., Hubbard, T. J. P., Kellis, M., Paten, B., Reymond, A., Tress, M. L., & Flicek, P. (2019). GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic Acids Res*, *47*(D1), D766-d773. <https://doi.org/10.1093/nar/gky955>
- Galle, P. R., Forner, A., Llovet, J. M. M., V.; Piscaglia, F.; Raoul, J., Schirmacher, P., & Vilgrain, V. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, *69*(1), 182-236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>
- Gan, Y., Han, N., He, X., Yu, J., Zhang, M., Zhou, Y., Liang, H., Deng, J., Zheng, Y., & Ge, W. (2017). Long non-coding RNA CASC2 regulates cell biological behaviour through the MAPK signalling pathway in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology*, *39*(6), 1010428317706229.
- Gao, P., Wong, C. C.-L., Tung, E. K.-K., Lee, J. M.-F., Wong, C.-M., & Ng, I. O.-L. (2011). Deregulation of microRNA expression occurs early and accumulates in early stages of HBV-associated multistep hepatocarcinogenesis. *Journal of hepatology*, *54*(6), 1177-1184.
- Gao, P., Wong, C. C., Tung, E. K., Lee, J. M., Wong, C. M., & Ng, I. O. (2011). Deregulation of microRNA expression occurs early and accumulates in early stages of HBV-associated multistep hepatocarcinogenesis. *J Hepatol*, *54*(6), 1177-1184. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.09.023>
- Ge, X., Wang, Y., Nie, J., Li, Q., Tang, L., Deng, X., Wang, F., Xu, B., Wu, X., & Zhang, X. (2017). The diagnostic/prognostic potential and molecular functions of long non-coding RNAs in the exosomes derived from the bile of human cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, *8*(41), 69995.
- Gellert-Kristensen, H., Richardson, T. G., Davey Smith, G., Nordestgaard, B. G., Tybjaerg-Hansen, A., & Stender, S. (2020). Combined Effect of PNPLA3, TM6SF2, and HSD17B13 Variants on Risk of Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in the General Population. *Hepatology*, *72*(3), 845-856. <https://doi.org/10.1002/hep.31238>
- Georgescu, M. M. (2010). PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer*, *1*(12), 1170-1177. <https://doi.org/10.1177/1947601911407325>
- Ghousein, A., Mosca, N., Cartier, F., Charpentier, J., Dupuy, J. W., Raymond, A. A., Bioulac-Sage, P., & Grosset, C. F. (2020). miR-4510 blocks hepatocellular carcinoma development through RAF1 targeting and RAS/RAF/MEK/ERK signalling inactivation. *Liver International*, *40*(1), 240-251.
- Gibb, E. A., Brown, C. J., & Lam, W. L. (2011). The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Molecular cancer*, *10*(1), 38.

- Golabi, P., Fazel, S., Otgonsuren, M., Sayiner, M., Locklear, C. T., & Younossi, Z. M. (2017). Mortality assessment of patients with hepatocellular carcinoma according to underlying disease and treatment modalities. *Medicine (Baltimore)*, 96(9), e5904. <https://doi.org/10.1097/md.0000000000005904>
- Gramantieri, L., Ferracin, M., Fornari, F., Veronese, A., Sabbioni, S., Liu, C. G., Calin, G. A., Giovannini, C., Ferrazzi, E., Grazi, G. L., Croce, C. M., Bolondi, L., & Negrini, M. (2007). Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 67(13), 6092-6099. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-06-4607>
- Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M.-C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., Wang, Y., Brzoska, P., Kong, B., Li, R., West, R. B., van de Vijver, M. J., Sukumar, S., & Chang, H. Y. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 464(7291), 1071-1076. <https://doi.org/10.1038/nature08975>
- Guro, E., Saban, C., Oral, O., Cigdem, A., & Armagan, A. (2006). Trends in Hepatitis B and Hepatitis C Virus among Blood Donors over 16 Years in Turkey. *European Journal of Epidemiology*, 21(4), 299-305. <https://doi.org/10.1007/s10654-006-0001-2>
- Gustin, J. A., Pincheira, R., Mayo, L. D., Ozes, O. N., Kessler, K. M., Baerwald, M. R., Korgaonkar, C. K., & Donner, D. B. (2004). Tumor necrosis factor activates CRE-binding protein through a p38 MAPK/MSK1 signaling pathway in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(3), C547-C555.
- Gutschner, T., & Diederichs, S. (2012). The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA biology*, 9(6), 703-719.
- Guttman, M., Donaghey, J., Carey, B. W., Garber, M., Grenier, J. K., Munson, G., Young, G., Lucas, A. B., Ach, R., Bruhn, L., Yang, X., Amit, I., Meissner, A., Regev, A., Rinn, J. L., Root, D. E., & Lander, E. S. (2011). lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature*, 477(7364), 295-300. <https://doi.org/10.1038/nature10398>
- Hann, H. W. (2008). Active antiviral therapy for chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 54(1), 19-30.
- Hanna, R. F., Miloushev, V. Z., Tang, A., Finklestone, L. A., Brejt, S. Z., Sandhu, R. S., Santillan, C. S., Wolfson, T., Gamst, A., & Sirlin, C. B. (2016). Comparative 13-year meta-analysis of the sensitivity and positive predictive value of ultrasound, CT, and MRI for detecting hepatocellular carcinoma. *Abdom Radiol (NY)*, 41(1), 71-90. <https://doi.org/10.1007/s00261-015-0592-8>
- Hao, X., Sun, G., Zhang, Y., Kong, X., Rong, D., Song, J., Tang, W., & Wang, X. (2021). Targeting Immune Cells in the Tumor Microenvironment of HCC: New Opportunities and Challenges [Systematic Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.775462>
- Harding, J. J., Abu-Zeinah, G., Chou, J. F., Owen, D. H., Ly, M., Lowery, M. A., Capanu, M., Do, R., Kemeny, N. E., O'Reilly, E. M., Saltz, L. B., & Abou-Alfa, G. K. (2018). Frequency, Morbidity, and Mortality of Bone Metastases in Advanced Hepatocellular

Carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw*, 16(1), 50-58.  
<https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.7024>

- Hernandez-Meza, G., von Felden, J., Gonzalez-Kozlova, E. E., Garcia-Lezana, T., Peix, J., Portela, A., Craig, A. J., Sayols, S., Schwartz, M., Losic, B., Mazzaferro, V., Esteller, M., Llovet, J. M., & Villanueva, A. (2021). DNA Methylation Profiling of Human Hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 74(1), 183-199. <https://doi.org/10.1002/hep.31659>
- Hirsova, P., Bohm, F., Dohnalkova, E., Nozickova, B., Heikenwalder, M., Gores, G. J., & Weber, A. (2020). Hepatocyte apoptosis is tumor promoting in murine nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Death Dis*, 11(2), 80. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2283-9>
- Hoshida, Y., Nijman, S. M., Kobayashi, M., Chan, J. A., Brunet, J.-P., Chiang, D. Y., Villanueva, A., Newell, P., Ikeda, K., & Hashimoto, M. (2009). Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, 69(18), 7385-7392.
- Hoshida, Y., Toffanin, S., Lachenmayer, A., Villanueva, A., Minguez, B., & Llovet, J. M. (2010). Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis*, 30(1), 35-51. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1247131>
- Hou, J., Wang, P., Lin, L., Liu, X., Ma, F., An, H., Wang, Z., & Cao, X. (2009). MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol*, 183(3), 2150-2158. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900707>
- Huang, X. H., Wang, Q., Chen, J. S., Fu, X. H., Chen, X. L., Chen, L. Z., Li, W., Bi, J., Zhang, L. J., Fu, Q., Zeng, W. T., Cao, L. Q., Tan, H. X., & Su, Q. (2009). Bead-based microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma: miR-338 is downregulated. *Hepatol Res*, 39(8), 786-794. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2009.00502.x>
- Huang, Z., Zhou, J.-K., Peng, Y., He, W., & Huang, C. (2020). The role of long noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer*, 19(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01188-4>
- Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M. J., Kenzelmann-Broz, D., Khalil, A. M., Zuk, O., Amit, I., Rabani, M., Attardi, L. D., Regev, A., Lander, E. S., Jacks, T., & Rinn, J. L. (2010). A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*, 142(3), 409-419. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.040>
- Hussain, S. P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X. W., & Harris, C. C. (2007). TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*, 26(15), 2166-2176. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210279>
- Iacona, J. R., & Lutz, C. S. (2019). miR-146a-5p: expression, regulation, and functions in cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 10(4), e1533.
- Iborra, M., Bernuzzi, F., Invernizzi, P., & Danese, S. (2012). MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev*, 11(5), 305-314. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.07.002>

- Ikeda, K., Marusawa, H., Osaki, Y., Nakamura, T., Kitajima, N., Yamashita, Y., Kudo, M., Sato, T., & Chiba, T. (2007). Antibody to hepatitis B core antigen and risk for hepatitis C-related hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Ann Intern Med*, *146*(9), 649-656. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-146-9-200705010-00008>
- Ioannou, G. N., Green, P., Kerr, K. F., & Berry, K. (2019). Models estimating risk of hepatocellular carcinoma in patients with alcohol or NAFLD-related cirrhosis for risk stratification. *J Hepatol*, *71*(3), 523-533. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.05.008>
- Ioannou, G. N., Splan, M. F., Weiss, N. S., McDonald, G. B., Beretta, L., & Lee, S. P. (2007). Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *5*(8), 938-945, 945.e931-934. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.02.039>
- Iwasaki, W., Miya, Y., Horikoshi, N., Osakabe, A., Taguchi, H., Tachiwana, H., Shibata, T., Kagawa, W., & Kurumizaka, H. (2013). Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio*, *3*, 363-369. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.08.007>
- Jain, D. (2014). Tissue diagnosis of hepatocellular carcinoma. *J Clin Exp Hepatol*, *4*(Suppl 3), S67-73. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2014.03.047>
- Jalvy-Delvaile, S., Maurel, M., Majo, V., Pierre, N., Chabas, S., Combe, C., Rosenbaum, J., Saggiocco, F., & Grosset, C. F. (2012). Molecular basis of differential target regulation by miR-96 and miR-182: the Glypican-3 as a model. *Nucleic Acids Research*, *40*(3), 1356-1365.
- Jemal, A., Ward, E. M., Johnson, C. J., Cronin, K. A., Ma, J., Ryerson, B., Mariotto, A., Lake, A. J., Wilson, R., Sherman, R. L., Anderson, R. N., Henley, S. J., Kohler, B. A., Penberthy, L., Feuer, E. J., & Weir, H. K. (2017). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. *J Natl Cancer Inst*, *109*(9). <https://doi.org/10.1093/jnci/djx030>
- Ji, J., Dai, X., Yeung, S.-C. J., & He, X. (2019). The role of long non-coding RNA GAS5 in cancers. *Cancer management and research*, *11*, 2729.
- Jiang, J., Gusev, Y., Aderca, I., Mettler, T. A., Nagorney, D. M., Brackett, D. J., Roberts, L. R., & Schmittgen, T. D. (2008). Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res*, *14*(2), 419-427. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-07-0523>
- Jin, Y., Wong, Y. S., Goh, B. K. P., Chan, C. Y., Cheow, P. C., Chow, P. K. H., Lim, T. K. H., Goh, G. B. B., Krishnamoorthy, T. L., Kumar, R., Ng, T. P., Chong, S. S., Tan, H. H., Chung, A. Y. F., Ooi, L., Chang, J. P. E., Tan, C. K., & Lee, C. G. L. (2019). Circulating microRNAs as Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep*, *9*(1), 10464. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46872-8>
- JLopez-Berestein, C. M.-R. C., & GSood, A. (2011). MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*, *8*, 467477.
- Johnson, P. J. (2001). The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*, *5*(1), 145-159. [https://doi.org/10.1016/s1089-3261\(05\)70158-6](https://doi.org/10.1016/s1089-3261(05)70158-6)

- Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C., Suzuki, M., & Kawai, J. (2005). Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science*, *309*(5740), 1564-1566.
- Kawai, H., Suda, T., Aoyagi, Y., Isokawa, O., Mita, Y., Waguri, N., Kuroiwa, T., Igarashi, M., Tsukada, K., Mori, S., Shimizu, T., Suzuki, Y., Abe, Y., Takahashi, T., Nomoto, M., & Asakura, H. (2000). Quantitative evaluation of genomic instability as a possible predictor for development of hepatocellular carcinoma: comparison of loss of heterozygosity and replication error. *Hepatology*, *31*(6), 1246-1250. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.7298>
- Kern, F., Aparicio-Puerta, E., Li, Y., Fehlmann, T., Kehl, T., Wagner, V., Ray, K., Ludwig, N., Lenhof, H.-P., & Meese, E. (2021). miRTargetLink 2.0—interactive miRNA target gene and target pathway networks. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W409-W416.
- Khalaf, A. M., Fuentes, D., Morshid, A. I., Burke, M. R., Kaseb, A. O., Hassan, M., Hazle, J. D., & Elsayes, K. M. (2018). Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *J Hepatocell Carcinoma*, *5*, 61-73. <https://doi.org/10.2147/jhc.S156701>
- Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B. E., van Oudenaarden, A., Regev, A., Lander, E. S., & Rinn, J. L. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(28), 11667-11672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904715106>
- Kim, B. K., Park, J. Y., Kim, D. Y., Kim, J. K., Kim, K. S., Choi, J. S., Moon, B. S., Han, K. H., Chon, C. Y., Moon, Y. M., & Ahn, S. H. (2008). Persistent hepatitis B viral replication affects recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Liver Int*, *28*(3), 393-401. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2007.01625.x>
- Kim, B. K., Revill, P. A., & Ahn, S. H. (2011). HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antivir Ther*, *16*(8), 1169-1186. <https://doi.org/10.3851/imp1982>
- Kim, Y.-A., Park, K.-K., & Lee, S.-J. (2020). LncRNAs Act as a Link between Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *International journal of molecular sciences*, *21*(8), 2883. <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/8/2883>
- Kino, T., Hurt, D. E., Ichijo, T., Nader, N., & Chrousos, G. P. (2010). Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal*, *3*(107), ra8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000568>
- Klingenberg, M., Matsuda, A., Diederichs, S., & Patel, T. (2017). Non-coding RNA in hepatocellular carcinoma: Mechanisms, biomarkers and therapeutic targets. *J Hepatol*, *67*(3), 603-618. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.04.009>
- Kondo, Y., Kogure, T., Ninomiya, M., Fukuda, R., Monma, N., Ikeo, K., & Tanaka, Y. (2019). The reduction of miR146b-5p in monocytes and T cells could contribute to the immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Scientific reports*, *9*(1), 13393. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49706-9>

- Kong, J., Zhou, X., Liu, S., Jin, T., Piao, Y., Liu, C., & Lin, Z. (2014). Overexpression of sineoculis homeobox homolog 1 predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(6), 3018.
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue), D152-157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>
- Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., & Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 37(5), 495-500. <https://doi.org/10.1038/ng1536>
- Kubo, S., Hirohashi, K., Yamazaki, O., Matsuyama, M., Tanaka, H., Horii, K., Shuto, T., Yamamoto, T., Kawai, S., Wakasa, K., Nishiguchi, S., & Kinoshita, H. (2002). Effect of the presence of hepatitis B e antigen on prognosis after liver resection for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B. *World J Surg*, 26(5), 555-560. <https://doi.org/10.1007/s00268-001-0267-1>
- Kudo, M., Finn, R. S., Qin, S., Han, K. H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park, J. W., Han, G., Jassem, J., Blanc, J. F., Vogel, A., Komov, D., Evans, T. R. J., Lopez, C., Dutcus, C., Guo, M., Saito, K., Kraljevic, S., Tamai, T., Ren, M., & Cheng, A. L. (2018). Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, 391(10126), 1163-1173. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)30207-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)30207-1)
- Kulik, L., & El-Serag, H. B. (2019). Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 156(2), 477-491.e471. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.065>
- Kumar, M., Zhao, X., & Wang, X. W. (2011). Molecular carcinogenesis of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: one step closer to personalized medicine? *Cell Biosci*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-1-5>
- Ladeiro, Y., Couchy, G., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., Pelletier, L., Rebouissou, S., & Zucman-Rossi, J. (2008). MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology*, 47(6), 1955-1963. <https://doi.org/10.1002/hep.22256>
- Lai, M. C., Yang, Z., Zhou, L., Zhu, Q. Q., Xie, H. Y., Zhang, F., Wu, L. M., Chen, L. M., & Zheng, S. S. (2012). Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Med Oncol*, 29(3), 1810-1816. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-0004-z>
- Lánczky, A., & Györffy, B. (2021). Web-Based Survival Analysis Tool Tailored for Medical Research (KMplot): Development and Implementation. *J Med Internet Res*, 23(7), e27633. <https://doi.org/10.2196/27633>
- Lencioni, R., de Baere, T., Soulen, M. C., Rilling, W. S., & Geschwind, J. F. (2016). Lipiodol transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: A systematic review of efficacy and safety data. *Hepatology*, 64(1), 106-116. <https://doi.org/10.1002/hep.28453>

- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, *120*(1), 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>
- Li, C., Miao, R., Liu, S., Wan, Y., Zhang, S., Deng, Y., Bi, J., Qu, K., Zhang, J., & Liu, C. (2017). Down-regulation of miR-146b-5p by long noncoding RNA MALAT1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer growth and metastasis. *Oncotarget*, *8*(17), 28683.
- Li, J., Liu, N., Tang, L., Yan, B., Chen, X., Zhang, J., & Peng, C. (2020). The relationship between TRAF6 and tumors. *Cancer Cell International*, *20*(1), 1-12.
- Li, J., Wang, X., Tang, J., Jiang, R., Zhang, W., Ji, J., & Sun, B. (2015). HULC and Linc00152 Act as Novel Biomarkers in Predicting Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Cell Physiol Biochem*, *37*(2), 687-696. <https://doi.org/10.1159/000430387>
- Li, J., Wang, Y., Yu, W., Chen, J., & Luo, J. (2011). Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance. *Biochem Biophys Res Commun*, *406*(1), 70-73. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.01.111>
- Li, S. P., Xu, H. X., Yu, Y., He, J. D., Wang, Z., Xu, Y. J., Wang, C. Y., Zhang, H. M., Zhang, R. X., Zhang, J. J., Yao, Z., & Shen, Z. Y. (2016). LncRNA HULC enhances epithelial-mesenchymal transition to promote tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma via the miR-200a-3p/ZEB1 signaling pathway. *Oncotarget*, *7*(27), 42431-42446. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9883>
- Li, T., Leong, M. H., Harms, B., Kennedy, G., & Chen, L. (2013). MicroRNA-21 as a potential colon and rectal cancer biomarker. *World J Gastroenterol*, *19*(34), 5615-5621. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i34.5615>
- Li, Y., Wang, Y., Yu, L., Sun, C., Cheng, D., Yu, S., Wang, Q., Yan, Y., Kang, C., & Jin, S. (2013). miR-146b-5p inhibits glioma migration and invasion by targeting MMP16. *Cancer letters*, *339*(2), 260-269.
- Li, Y., Zhang, H., Dong, Y., Fan, Y., Li, Y., Zhao, C., Liu, J., Li, X., Dong, M., & Liu, H. (2017). MiR-146b-5p functions as a suppressor miRNA and prognosis predictor in non-small cell lung cancer. *Journal of Cancer*, *8*(9), 1704.
- Licursi, V., Conte, F., Fiscon, G., & Paci, P. (2019). MIENTURNET: an interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based analysis. *BMC bioinformatics*, *20*(1), 1-10.
- Lin, C. L., & Kao, J. H. (2011). The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J Gastroenterol Hepatol*, *26 Suppl 1*, 123-130. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06541.x>
- Lin, C. P., Liu, C. R., Lee, C. N., Chan, T. S., & Liu, H. E. (2010). Targeting c-Myc as a novel approach for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*, *2*(1), 16-20. <https://doi.org/10.4254/wjh.v2.i1.16>
- Lin, S., Nascimento, E. M., Gajera, C. R., Chen, L., Neuhöfer, P., Garbuzov, A., Wang, S., & Artandi, S. E. (2018). Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the

- liver in homeostasis and injury. *Nature*, 556(7700), 244-248. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0004-7>
- Lin, X. J., Chong, Y., Guo, Z. W., Xie, C., Yang, X. J., Zhang, Q., Li, S. P., Xiong, Y., Yuan, Y., Min, J., Jia, W. H., Jie, Y., Chen, M. S., Chen, M. X., Fang, J. H., Zeng, C., Zhang, Y., Guo, R. P., Wu, Y., Lin, G., Zheng, L., & Zhuang, S. M. (2015). A serum microRNA classifier for early detection of hepatocellular carcinoma: a multicentre, retrospective, longitudinal biomarker identification study with a nested case-control study. *Lancet Oncol*, 16(7), 804-815. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(15\)00048-0](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(15)00048-0)
- Link, T., & Iwakuma, T. (2017). Roles of p53 in extrinsic factor-induced liver carcinogenesis. *Hepatoma Res*, 3, 95-104. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2017.07>
- Liu, J., Xu, J., Li, H., Sun, C., Yu, L., Li, Y., Shi, C., Zhou, X., Bian, X., & Ping, Y. (2015). miR-146b-5p functions as a tumor suppressor by targeting TRAF6 and predicts the prognosis of human gliomas. *Oncotarget*, 6(30), 29129.
- Liu, Y., Zhang, H., Han, X., & Xing, X. (2022). Bioinformatics Methods Reveal the Biomarkers and the miRNA-mRNA Network in Hepatocellular Carcinoma. *J Healthc Eng*, 2022, 9963096. <https://doi.org/10.1155/2022/9963096>
- Liu, Z., Wang, Y., Dou, C., Sun, L., Li, Q., Wang, L., Xu, Q., Yang, W., Liu, Q., & Tu, K. (2018). MicroRNA-1468 promotes tumor progression by activating PPAR- $\gamma$ -mediated AKT signaling in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 1-14.
- Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., & Finn, R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- Llovet, J. M., Pinyol, R., Kelley, R. K., El-Khoueiry, A., Reeves, H. L., Wang, X. W., Gores, G. J., & Villanueva, A. (2022). Molecular pathogenesis and systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Cancer*, 3(4), 386-401. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00357-2>
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J. F., Borbath, I., Häussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D., & Bruix, J. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359(4), 378-390. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0708857>
- Llovet, J. M., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., Sangro, B., Schwartz, M., Sherman, M., & Gores, G. (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16018. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.18>
- Locarnini, S., & Zoulim, F. (2010). Molecular genetics of HBV infection. *Antivir Ther*, 15 Suppl 3, 3-14. <https://doi.org/10.3851/imp1619>
- Lok, A. S., Seeff, L. B., Morgan, T. R., di Bisceglie, A. M., Sterling, R. K., Curto, T. M., Everson, G. T., Lindsay, K. L., Lee, W. M., Bonkovsky, H. L., Dienstag, J. L., Ghany, M. G., Morishima, C., & Goodman, Z. D. (2009). Incidence of hepatocellular carcinoma

- and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology*, 136(1), 138-148. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.014>
- Marengo, A., Rosso, C., & Bugianesi, E. (2016). Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annual Review of Medicine*, 67(1), 103-117. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-090514-013832>
- Marrero, J. A., Feng, Z., Wang, Y., Nguyen, M. H., Befeler, A. S., Roberts, L. R., Reddy, K. R., Harnois, D., Llovet, J. M., Normolle, D., Dalhgren, J., Chia, D., Lok, A. S., Wagner, P. D., Srivastava, S., & Schwartz, M. (2009). Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 137(1), 110-118. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.04.005>
- Marrero, J. A., Fontana, R. J., Barrat, A., Askari, F., Conjeevaram, H. S., Su, G. L., & Lok, A. S. (2005). Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology*, 41(4), 707-716. <https://doi.org/10.1002/hep.20636>
- Marrero, J. A., Kulik, L. M., Sirlin, C. B., Zhu, A. X., Finn, R. S., Abecassis, M. M., Roberts, L. R., & Heimbach, J. K. (2018). Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 68(2), 723-750. <https://doi.org/10.1002/hep.29913>
- Marrone, A. K., & Ho, J. (2014). MicroRNAs: potential regulators of renal development genes that contribute to CAKUT. *Pediatr Nephrol*, 29(4), 565-574. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2599-0>
- Mathieu, J., & Ruohola-Baker, H. (2013). Regulation of stem cell populations by microRNAs. *Adv Exp Med Biol*, 786, 329-351. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6621-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6621-1_18)
- Matouk, I. J., DeGroot, N., Mezan, S., Ayesh, S., Abu-lail, R., Hochberg, A., & Galun, E. (2007). The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth. *PLoS one*, 2(9), e845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000845>
- Matsumoto, Y., Suzuki, T., Asada, I., Ozawa, K., Tobe, T., & Honjo, I. (1982). Clinical classification of hepatoma in Japan according to serial changes in serum alpha-fetoprotein levels. *Cancer*, 49(2), 354-360. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19820115\)49:2<354::aid-cnrcr2820490224>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19820115)49:2<354::aid-cnrcr2820490224>3.0.co;2-j)
- Mattick, J. S. (2003). Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays*, 25(10), 930-939.
- Mattick, J. S., & Makunin, I. V. (2005). Small regulatory RNAs in mammals. *Human molecular genetics*, 14(suppl\_1), R121-R132.
- Maurel, M., Jalvy, S., Ladeiro, Y., Combe, C., Vachet, L., Saggiocco, F., Bioulac-Sage, P., Pitard, V., Jacquemin-Sablon, H., & Zucman-Rossi, J. (2013). A functional screening identifies five microRNAs controlling glypican-3: role of miR-1271 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 57(1), 195-204.
- McGlynn, K. A., Petrick, J. L., & El-Serag, H. B. (2021). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 73 Suppl 1(Suppl 1), 4-13. <https://doi.org/10.1002/hep.31288>

- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S. T., & Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, *133*(2), 647-658. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.022>
- Mistik, R. (2007). The epidemiology of viral hepatitis in Turkey: analysis of published data. *Viral Hepatit. Volume*, *1*(1).
- Mittal, S., El-Serag, H. B., Sada, Y. H., Kanwal, F., Duan, Z., Temple, S., May, S. B., Kramer, J. R., Richardson, P. A., & Davila, J. A. (2016). Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *14*(1), 124-131.e121. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.07.019>
- Mohammed, I. F., Al-Mustawfi, N., & Kaka, L. N. (2007). Promotion of regenerative processes in injured peripheral nerve induced by low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*, *25*(2), 107-111. <https://doi.org/10.1089/pho.2006.1090>
- Monga, S. P. (2015).  $\beta$ -catenin signaling and roles in liver homeostasis, injury, and tumorigenesis. *Gastroenterology*, *148*(7), 1294-1310.
- Moon, R. T. (2005). Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE*, *2005*(271), cm1. <https://doi.org/10.1126/stke.2712005cm1>
- Morishita, A., Oura, K., Tadokoro, T., Fujita, K., Tani, J., & Masaki, T. (2021). MicroRNAs in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Cancers (Basel)*, *13*(3). <https://doi.org/10.3390/cancers13030514>
- Moseley, M. L., Zu, T., Ikeda, Y., Gao, W., Mosemiller, A. K., Daughters, R. S., Chen, G., Weatherspoon, M. R., Clark, H. B., Ebner, T. J., Day, J. W., & Ranum, L. P. (2006). Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat Genet*, *38*(7), 758-769. <https://doi.org/10.1038/ng1827>
- Mourtada-Maarabouni, M., Hedge, V. L., Kirkham, L., Farzaneh, F., & Williams, G. T. (2008). Growth arrest in human T-cells is controlled by the non-coding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5). *Journal of cell science*, *121*(7), 939-946.
- Mourtada-Maarabouni, M., Pickard, M. R., Hedge, V. L., Farzaneh, F., & Williams, G. T. (2009). GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene*, *28*(2), 195-208. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.373>
- Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., Urashima, T., Toyoda, H., Okanoue, T., & Shimotohno, K. (2006). Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, *25*(17), 2537-2545.
- Nagaraju, G. P., Dariya, B., Kasa, P., Peela, S., & El-Rayes, B. F. (2022). Epigenetics in hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol*, *86*(Pt 3), 622-632. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.07.017>
- Nash, K. L., Woodall, T., Brown, A. S., Davies, S. E., & Alexander, G. J. (2010). Hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection without cirrhosis. *World J Gastroenterol*, *16*(32), 4061-4065. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i32.4061>

- Nault, J. C., & Letouzé, E. (2019). Mutational Processes in Hepatocellular Carcinoma: The Story of Aristolochic Acid. *Semin Liver Dis*, 39(3), 334-340. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1685516>
- Ningarhari, M., Caruso, S., Hirsch, T. Z., Bayard, Q., Franconi, A., Védie, A. L., Noblet, B., Blanc, J. F., Amaddeo, G., Ganne, N., Ziol, M., Paradis, V., Guettier, C., Calderaro, J., Morcrette, G., Kim, Y., MacLeod, A. R., Nault, J. C., Rebouissou, S., & Zucman-Rossi, J. (2021). Telomere length is key to hepatocellular carcinoma diversity and telomerase addiction is an actionable therapeutic target. *J Hepatol*, 74(5), 1155-1166. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.052>
- Nishida, N., & Goel, A. (2011). Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Curr Genomics*, 12(2), 130-137. <https://doi.org/10.2174/138920211795564359>
- Okamoto, H., Tsuda, F., Akahane, Y., Sugai, Y., Yoshiba, M., Moriyama, K., Tanaka, T., Miyakawa, Y., & Mayumi, M. (1994). Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol*, 68(12), 8102-8110. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.12.8102-8110.1994>
- Palumbo, S., Miracco, C., Pirtoli, L., & Comincini, S. (2014). Emerging roles of microRNA in modulating cell-death processes in malignant glioma. *J Cell Physiol*, 229(3), 277-286. <https://doi.org/10.1002/jcp.24446>
- Pan, C. Y., & Lin, W. C. (2020). miR-TV: an interactive microRNA Target Viewer for microRNA and target gene expression interrogation for human cancer studies. *Database (Oxford)*, 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baz148>
- Panzitt, K., Tschernatsch, M. M., Guelly, C., Moustafa, T., Stradner, M., Strohmaier, H. M., Buck, C. R., Denk, H., Schroeder, R., Trauner, M., & Zatloukal, K. (2007). Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology*, 132(1), 330-342. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.026>
- Parizadeh, S. M., Jafarzadeh-Esfehani, R., Ghandehari, M., Goldani, F., Parizadeh, S. M., Hassanian, S. M., Ghayour-Mobarhan, M., Ferns, G. A., & Avan, A. (2019). MicroRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Current drug targets*, 20(11), 1129-1140.
- Paterson, M. R., & Kriegel, A. J. (2017). MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots. *Physiol Genomics*, 49(4), 243-252. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00133.2016>
- Pauli, A., Rinn, J. L., & Schier, A. F. (2011). Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nat Rev Genet*, 12(2), 136-149. <https://doi.org/10.1038/nrg2904>
- Petrack, J. L., Florio, A. A., Znaor, A., Ruggieri, D., Laversanne, M., Alvarez, C. S., Ferlay, J., Valery, P. C., Bray, F., & McGlynn, K. A. (2020). International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978-2012. *Int J Cancer*, 147(2), 317-330. <https://doi.org/10.1002/ijc.32723>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

- Pfister, D., Núñez, N. G., Pinyol, R., Govaere, O., Pinter, M., Szydłowska, M., Gupta, R., Qiu, M., Deczkowska, A., Weiner, A., Müller, F., Sinha, A., Friebel, E., Engleitner, T., Lenggenhager, D., Moncsek, A., Heide, D., Stirm, K., Kosla, J., Kotsiliti, E., Leone, V., Dudek, M., Yousuf, S., Inverso, D., Singh, I., Teijeiro, A., Castet, F., Montironi, C., Haber, P. K., Tiniakos, D., Bedossa, P., Cockell, S., Younes, R., Vacca, M., Marra, F., Schattenberg, J. M., Allison, M., Bugianesi, E., Ratziu, V., Pressiani, T., D'Alessio, A., Personeni, N., Rimassa, L., Daly, A. K., Scheiner, B., Pomej, K., Kirstein, M. M., Vogel, A., Peck-Radosavljevic, M., Hucke, F., Finkelmeier, F., Waidmann, O., Trojan, J., Schulze, K., Wege, H., Koch, S., Weinmann, A., Bueter, M., Rössler, F., Siebenhüner, A., De Dosso, S., Mallm, J. P., Umansky, V., Jugold, M., Luedde, T., Schietinger, A., Schirmacher, P., Emu, B., Augustin, H. G., Billeter, A., Müller-Stich, B., Kikuchi, H., Duda, D. G., Kütting, F., Waldschmidt, D. T., Ebert, M. P., Rahbari, N., Mei, H. E., Schulz, A. R., Ringelhan, M., Malek, N., Spahn, S., Bitzer, M., Ruiz de Galarreta, M., Lujambio, A., Dufour, J. F., Marron, T. U., Kaseb, A., Kudo, M., Huang, Y. H., Djouder, N., Wolter, K., Zender, L., Marche, P. N., Decaens, T., Pinato, D. J., Rad, R., Mertens, J. C., Weber, A., Unger, K., Meissner, F., Roth, S., Jilkova, Z. M., Claassen, M., Anstee, Q. M., Amit, I., Knolle, P., Becher, B., Llovet, J. M., & Heikenwalder, M. (2021). NASH limits anti-tumour surveillance in immunotherapy-treated HCC. *Nature*, 592(7854), 450-456. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03362-0>
- Pickard, M. R., & Williams, G. T. (2014). Regulation of apoptosis by long non-coding RNA GAS5 in breast cancer cells: implications for chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*, 145(2), 359-370. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2974-y>
- Pineau, P., Volinia, S., McJunkin, K., Marchio, A., Battiston, C., Terris, B., Mazzaferro, V., Lowe, S. W., Croce, C. M., & Dejean, A. (2010). miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(1), 264-269. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907904107>
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*, 4(9), e609-616. [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(16)30143-7)
- Polidoro, M. A., Mikulak, J., Cazzetta, V., Lleo, A., Mavilio, D., Torzilli, G., & Donadon, M. (2020). Tumor microenvironment in primary liver tumors: A challenging role of natural killer cells. *World J Gastroenterol*, 26(33), 4900-4918. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i33.4900>
- Ponting, C. P., Oliver, P. L., & Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, 136(4), 629-641. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.006>
- Poon, R. T., Fan, S. T., Lo, C. M., Liu, C. L., & Wong, J. (2002). 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*, 235(3), 373-382. <https://doi.org/10.1097/00000658-200203000-00009>
- Qi, P., Cheng, S.-q., Wang, H., Li, N., Chen, Y.-f., & Gao, C.-f. (2011). Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *PloS one*, 6(12), e28486.

- Qiu, L., Tang, Q., Li, G., & Chen, K. (2017). Long non-coding RNAs as biomarkers and therapeutic targets: recent insights into hepatocellular carcinoma. *Life sciences*, *191*, 273-282.
- Raisch, J., Darfeuille-Michaud, A., & Nguyen, H. T. (2013). Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J Gastroenterol*, *19*(20), 2985-2996. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i20.2985>
- Ranum, L. P., & Cooper, T. A. (2006). RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci*, *29*, 259-277. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113014>
- Raza, A., & Sood, G. K. (2014). Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine. *World J Gastroenterol*, *20*(15), 4115-4127. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i15.4115>
- Rebouissou, S., & Nault, J. C. (2020). Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, *72*(2), 215-229. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.017>
- Refolo, M. G., Messa, C., Guerra, V., Carr, B. I., & D'Alessandro, R. (2020). Inflammatory Mechanisms of HCC Development. *Cancers (Basel)*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/cancers12030641>
- Roayaie, S., Jibara, G., Tabrizian, P., Park, J. W., Yang, J., Yan, L., Schwartz, M., Han, G., Izzo, F., Chen, M., Blanc, J. F., Johnson, P., Kudo, M., Roberts, L. R., & Sherman, M. (2015). The role of hepatic resection in the treatment of hepatocellular cancer. *Hepatology*, *62*(2), 440-451. <https://doi.org/10.1002/hep.27745>
- Rossetto, A., De Re, V., Steffan, A., Ravaioli, M., Miolo, G., Leone, P., Racanelli, V., Uzzau, A., Baccarani, U., & Cescon, M. (2019). Carcinogenesis and Metastasis in Liver: Cell Physiological Basis. *Cancers (Basel)*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/cancers11111731>
- Röcken, C., & Carl-McGrath, S. (2001). Pathology and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis*, *19*(4), 269-278. <https://doi.org/10.1159/000050693>
- Russell, M. C. (2015). Complications following hepatectomy. *Surg Oncol Clin N Am*, *24*(1), 73-96. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2014.09.008>
- Sakamoto, K., & Nagano, H. (2018). Outcomes of surgery for hepatocellular carcinoma with tumor thrombus in the inferior vena cava or right atrium. *Surgery today*, *48*(9), 819-824.
- Sapisochin, G., Barry, A., Doherty, M., Fischer, S., Goldaracena, N., Rosales, R., Russo, M., Beecroft, R., Ghanekar, A., Bhat, M., Brierley, J., Greig, P. D., Knox, J. J., Dawson, L. A., & Grant, D. R. (2017). Stereotactic body radiotherapy vs. TACE or RFA as a bridge to transplant in patients with hepatocellular carcinoma. An intention-to-treat analysis. *J Hepatol*, *67*(1), 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.02.022>
- Schlageter, M., Terracciano, L. M., D'Angelo, S., & Sorrentino, P. (2014). Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, *20*(43), 15955-15964. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.15955>
- Schneider, C., King, R. M., & Philipson, L. (1988). Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*, *54*(6), 787-793.

- Schulze, K., Nault, J. C., & Villanueva, A. (2016). Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *J Hepatol*, 65(5), 1031-1042. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.035>
- Schuster, R., Gerlich, W. H., & Schaefer, S. (2000). Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene*, 19(9), 1173-1180. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203417>
- Seeger, C., & Mason, W. S. (2015). Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*, 479-480, 672-686. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.031>
- Sempoux, C., Balabaud, C., & Bioulac-Sage, P. (2014). Malignant transformation of hepatocellular adenoma. *Hepat Oncol*, 1(4), 421-431. <https://doi.org/10.2217/hep.14.14>
- Sevic, I., Spinelli, F. M., Cantero, M. J., Reszegi, A., Kovalszky, I., García, M. G., & Alaniz, L. (2019). The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma. In J. E. E. Tirnitz-Parker (Ed.), *Hepatocellular Carcinoma*. Codon Publications
- Copyright: The Authors. <https://doi.org/10.15586/hepatocellularcarcinoma.2019.ch2>
- Sia, D., Villanueva, A., Friedman, S. L., & Llovet, J. M. (2017). Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*, 152(4), 745-761. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.048>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*, 71(1), 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Singh, T. R., Gupta, A., & Suravajhala, P. (2013). Challenges in the miRNA research. *Int J Bioinform Res Appl*, 9(6), 576-583. <https://doi.org/10.1504/ijbra.2013.056620>
- Slack, F. J., & Chinnaiyan, A. M. (2019). The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell*, 179(5), 1033-1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.017>
- Song, K., Han, C., Zhang, J., Lu, D., Dash, S., Feitelson, M., Lim, K., & Wu, T. (2013). Epigenetic regulation of MicroRNA-122 by peroxisome proliferator activated receptor-gamma and hepatitis b virus X protein in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, 58(5), 1681-1692. <https://doi.org/10.1002/hep.26514>
- Song, P.-P., Xia, J.-F., Inagaki, Y., Hasegawa, K., Sakamoto, Y., Kokudo, N., & Tang, W. (2016). Controversies regarding and perspectives on clinical utility of biomarkers in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 22(1), 262.
- Spizzo, R., Almeida, M. I. e., Colombatti, A., & Calin, G. A. (2012). Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? *Oncogene*, 31(43), 4577-4587.
- St Laurent, G., Wahlestedt, C., & Kapranov, P. (2015). The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet*, 31(5), 239-251. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.007>
- Stallcup, M. R. (2001). Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene*, 20(24), 3014-3020. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204325>

- Sterling, R. K., Wright, E. C., Morgan, T. R., Seeff, L. B., Hoefs, J. C., Di Bisceglie, A. M., Dienstag, J. L., & Lok, A. S. (2012). Frequency of elevated hepatocellular carcinoma (HCC) biomarkers in patients with advanced hepatitis C. *Am J Gastroenterol*, *107*(1), 64-74. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.312>
- Stokowy, T., Gawel, D., & Wojtas, B. (2016). Differences in miRNA and mRNA profile of papillary thyroid cancer variants. *International journal of endocrinology*, *2016*.
- Su, H., Yang, J. R., Xu, T., Huang, J., Xu, L., Yuan, Y., & Zhuang, S. M. (2009). MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res*, *69*(3), 1135-1142. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-08-2886>
- Sui, C. J., Xu, F., Shen, W. F., Dai, B. H., Lu, J. J., Zhang, M. F., & Yang, J. M. (2016). MicroRNA-147 suppresses human hepatocellular carcinoma proliferation migration and chemosensitivity by inhibiting HOXC6. *Am J Cancer Res*, *6*(12), 2787-2798.
- Sun, H. C., Zhang, W., Qin, L. X., Zhang, B. H., Ye, Q. H., Wang, L., Ren, N., Zhuang, P. Y., Zhu, X. D., Fan, J., & Tang, Z. Y. (2007). Positive serum hepatitis B e antigen is associated with higher risk of early recurrence and poorer survival in patients after curative resection of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, *47*(5), 684-690. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.06.019>
- Sun, T., Annunziato, S., Bergling, S., Sheng, C., Orsini, V., Forcella, P., Pikiolak, M., Kancherla, V., Holwerda, S., Imanci, D., Wu, F., Meylan, L. C., Puehringer, L. F., Waldt, A., Oertli, M., Schuierer, S., Terracciano, L. M., Reinker, S., Ruffner, H., Bouwmeester, T., Sailer, A. W., George, E., Roma, G., de Weck, A., Piscuoglio, S., Lohmann, F., Naumann, U., Liberali, P., Cong, F., & Tchorz, J. S. (2021). ZNRF3 and RNF43 cooperate to safeguard metabolic liver zonation and hepatocyte proliferation. *Cell Stem Cell*, *28*(10), 1822-1837.e1810. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.05.013>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, *71*(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Swenson, P. D., Riess, J. T., & Krueger, L. E. (1991). Determination of HBsAg subtypes in different high risk populations using monoclonal antibodies. *J Virol Methods*, *33*(1-2), 27-38. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(91\)90004-j](https://doi.org/10.1016/0166-0934(91)90004-j)
- Tabrizian, P., Jibara, G., Shrager, B., Schwartz, M., & Roayaie, S. (2015). Recurrence of hepatocellular cancer after resection: patterns, treatments, and prognosis. *Ann Surg*, *261*(5), 947-955. <https://doi.org/10.1097/sla.0000000000000710>
- Tai, Y., Zhao, C., Gao, J., Lan, T., & Tong, H. (2021). Identification of miRNA-target gene regulatory networks in liver fibrosis based on bioinformatics analysis. *PeerJ*, *9*, e11910. <https://doi.org/10.7717/peerj.11910>
- Tang, A., Bashir, M. R., Corwin, M. T., Cruite, I., Dietrich, C. F., Do, R. K. G., Ehman, E. C., Fowler, K. J., Hussain, H. K., Jha, R. C., Karam, A. R., Mamidipalli, A., Marks, R. M., Mitchell, D. G., Morgan, T. A., Ohliger, M. A., Shah, A., Vu, K. N., & Sirlin, C. B. (2018). Evidence Supporting LI-RADS Major Features for CT- and MR Imaging-based

Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. *Radiology*, 286(1), 29-48. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017170554>

- Terradillos, O., Pollicino, T., Lecoeur, H., Tripodi, M., Gougeon, M. L., Tiollais, P., & Buendia, M. A. (1998). p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro. *Oncogene*, 17(16), 2115-2123. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202432>
- Thiele, M., Glud, L. L., Fialla, A. D., Dahl, E. K., & Krag, A. (2014). Large variations in risk of hepatocellular carcinoma and mortality in treatment naïve hepatitis B patients: systematic review with meta-analyses. *PloS one*, 9(9), e107177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107177>
- Thorgeirsson, S. S., & Grisham, J. W. (2002). Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*, 31(4), 339-346.
- Thurnherr, T., Mah, W.-C., Lei, Z., Jin, Y., Rozen, S. G., & Lee, C. G. (2016). Differentially expressed miRNAs in hepatocellular carcinoma target genes in the genetic information processing and metabolism pathways. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Tian, Z. Z., Guo, X. J., Zhao, Y. M., & Fang, Y. (2015). Decreased expression of long non-coding RNA MEG3 acts as a potential predictor biomarker in progression and poor prognosis of osteosarcoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(11), 15138-15142.
- Toh, T. B., Lim, J. J., & Chow, E. K. (2019). Epigenetics of hepatocellular carcinoma. *Clin Transl Med*, 8(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40169-019-0230-0>
- Torrecilla, S., Sia, D., Harrington, A. N., Zhang, Z., Cabellos, L., Cornella, H., Moeini, A., Camprecios, G., Leow, W. Q., Fiel, M. I., Hao, K., Bassaganyas, L., Mahajan, M., Thung, S. N., Villanueva, A., Florman, S., Schwartz, M. E., & Llovet, J. M. (2017). Trunk mutational events present minimal intra- and inter-tumoral heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 67(6), 1222-1231. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.013>
- Tosun, S. (2013). Viral hepatitlerin ülkemizdeki değişen epidemiyolojisi. *Ankem Derg*, 27(Suppl 2), 128-134.
- Tremosini, S., Forner, A., Boix, L., Vilana, R., Bianchi, L., Reig, M., Rimola, J., Rodríguez-Lope, C., Ayuso, C., Solé, M., & Bruix, J. (2012). Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut*, 61(10), 1481-1487. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301862>
- Trépo, C., Chan, H. L. Y., & Lok, A. (2014). Hepatitis B virus infection. *The Lancet*, 384(9959), 2053-2063. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60220-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60220-8)
- Tseng, T. C., Liu, C. J., Yang, H. C., Su, T. H., Wang, C. C., Chen, C. L., Kuo, S. F., Liu, C. H., Chen, P. J., Chen, D. S., & Kao, J. H. (2012). High levels of hepatitis B surface antigen increase risk of hepatocellular carcinoma in patients with low HBV load. *Gastroenterology*, 142(5), 1140-1149.e1143; quiz e1113-1144. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.007>

- Tu, Z. Q., Li, R. J., Mei, J. Z., & Li, X. H. (2014). Down-regulation of long non-coding RNA GAS5 is associated with the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(7), 4303-4309.
- Unfried, J. P., & Fortes, P. (2020). LncRNAs in HCV Infection and HCV-Related Liver Disease. *Int J Mol Sci*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21062255>
- Utsunomiya, I. (2005). Pathological study on multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma. *Kurume Med J*, 52(4), 133-138. <https://doi.org/10.2739/kurumemedj.52.133>
- Velázquez, R. F., Rodríguez, M., Navascués, C. A., Linares, A., Pérez, R., Sotorríos, N. G., Martínez, I., & Rodrigo, L. (2003). Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*, 37(3), 520-527.
- Venook, A. P., Papandreou, C., Furuse, J., & de Guevara, L. L. (2010). The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist*, 15 Suppl 4, 5-13. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-S4-05>
- Vitali, P., Royo, H., Marty, V., Bortolin-Cavaillé, M.-L., & Cavaillé, J. (2010). Long nuclear-retained non-coding RNAs and allele-specific higher-order chromatin organization at imprinted snoRNA gene arrays. *J Cell Sci*, 123(1), 70-83.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C., & Croce, C. M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7), 2257-2261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510565103>
- Wan, P., Su, W., & Zhuo, Y. (2017). The Role of Long Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*, 54(3), 2012-2021. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9793-6>
- Wang, C. Y., & Li, S. (2019). Clinical characteristics and prognosis of 2887 patients with hepatocellular carcinoma: A single center 14 years experience from China. *Medicine (Baltimore)*, 98(4), e14070. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000014070>
- Wang, J., Liu, X., Wu, H., Ni, P., Gu, Z., Qiao, Y., Chen, N., Sun, F., & Fan, Q. (2010). CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic Acids Res*, 38(16), 5366-5383. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq285>
- Wang, K., Lim, H. Y., Shi, S., Lee, J., Deng, S., Xie, T., Zhu, Z., Wang, Y., Pocalyko, D., Yang, W. J., Rejto, P. A., Mao, M., Park, C. K., & Xu, J. (2013). Genomic landscape of copy number aberrations enables the identification of oncogenic drivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 58(2), 706-717. <https://doi.org/10.1002/hep.26402>
- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 43(6), 904-914. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.018>
- Wang, T. H., Lin, Y. S., Chen, Y., Yeh, C. T., Huang, Y. L., Hsieh, T. H., Shieh, T. M., Hsueh, C., & Chen, T. C. (2015). Long non-coding RNA AOC4P suppresses hepatocellular carcinoma metastasis by enhancing vimentin degradation and inhibiting epithelial-

- mesenchymal transition. *Oncotarget*, 6(27), 23342-23357. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4344>
- Wang, Y. G., Wang, P., Wang, B., Fu, Z. J., Zhao, W. J., & Yan, S. L. (2014). Diabetes mellitus and poorer prognosis in hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS one*, 9(5), e95485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095485>
- Wapinski, O., & Chang, H. Y. (2011). Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol*, 21(6), 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.04.001>
- Webster, J. C., Huber, R. M., Hanson, R. L., Collier, P. M., Haws, T. F., Mills, J. K., Burn, T. C., & Allegretto, E. A. (2002). Dexamethasone and tumor necrosis factor-alpha act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. *Endocrinology*, 143(10), 3866-3874. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220188>
- Wei, T., Zhang, L.-N., Lv, Y., Ma, X.-Y., Zhi, L., Liu, C., Ma, F., & Zhang, X.-F. (2014). Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha promotes tumor progression and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 5(21), 10307.
- Weidle, U. H., Schmid, D., Birzele, F., & Brinkmann, U. (2020). MicroRNAs Involved in Metastasis of Hepatocellular Carcinoma: Target Candidates, Functionality and Efficacy in Animal Models and Prognostic Relevance. *Cancer Genomics Proteomics*, 17(1), 1-21. <https://doi.org/10.21873/cgp.20163>
- White, D. L., Thrift, A. P., Kanwal, F., Davila, J., & El-Serag, H. B. (2017). Incidence of Hepatocellular Carcinoma in All 50 United States, From 2000 Through 2012. *Gastroenterology*, 152(4), 812-820.e815. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.020>
- Williams, G. T., Mourtada-Maarabouni, M., & Farzaneh, F. (2011). A critical role for non-coding RNA GAS5 in growth arrest and rapamycin inhibition in human T-lymphocytes. *Biochem Soc Trans*, 39(2), 482-486. <https://doi.org/10.1042/bst0390482>
- Witczak-Malinowska, K., Zadrozny, D., Studniarek, M., Szurowska, E., Michalska, Z., Stalke, P., Sikorska, K., & Lakomy, E. A. (2003). Preliminary assessment of utility of radiofrequency ablation technique in treatment of primary hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with hepatic cirrhosis. *Med Sci Monit*, 9 Suppl 3, 68-72.
- Wong, L. S., & Wong, C. M. (2021). Decoding the Roles of Long Noncoding RNAs in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/ijms22063137>
- Wu, F., Zikusoka, M., Trindade, A., Dassopoulos, T., Harris, M. L., Bayless, T. M., Brant, S. R., Chakravarti, S., & Kwon, J. H. (2008). MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology*, 135(5), 1624-1635.e1624. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.068>
- Wu, J. C., Huang, Y. H., Chau, G. Y., Su, C. W., Lai, C. R., Lee, P. C., Huo, T. I., Sheen, I. J., Lee, S. D., & Lui, W. Y. (2009). Risk factors for early and late recurrence in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 51(5), 890-897. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.07.009>

- Xia, J., Benner, M. J., & Hancock, R. E. (2014). NetworkAnalyst-integrative approaches for protein–protein interaction network analysis and visual exploration. *Nucleic Acids Research*, *42*(W1), W167-W174.
- Xiang, M., Birkbak, N. J., Vafaizadeh, V., Walker, S. R., Yeh, J. E., Liu, S., Kroll, Y., Boldin, M., Taganov, K., Groner, B., Richardson, A. L., & Frank, D. A. (2014). STAT3 induction of miR-146b forms a feedback loop to inhibit the NF- $\kappa$ B to IL-6 signaling axis and STAT3-driven cancer phenotypes. *Sci Signal*, *7*(310), ra11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004497>
- Xiao, C., Wu, C. H., & Hu, H. Z. (2016). LncRNA UCA1 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) of breast cancer cells via enhancing Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *20*(13), 2819-2824.
- Xie, J., Cheng, N., Huang, Z., Shu, X., & Xiang, T. (2022). miR-146b-5p activation of hepatic stellate cells contributes to the progression of fibrosis by directly targeting HIPK1. *Exp Ther Med*, *24*(2), 537. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11474>
- Xie, Y. (2017). Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Adv Exp Med Biol*, *1018*, 11-21. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-5765-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5765-6_2)
- Xiong, H., Li, B., He, J., Zeng, Y., Zhang, Y., & He, F. (2017). lncRNA HULC promotes the growth of hepatocellular carcinoma cells via stabilizing COX-2 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *490*(3), 693-699.
- Xu, J., An, P., Winkler, C. A., & Yu, Y. (2020). Dysregulated microRNAs in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: potential as biomarkers and therapeutic targets. *Frontiers in oncology*, *10*, 1271.
- Xu, J., Wu, C., Che, X., Wang, L., Yu, D., Zhang, T., Huang, L., Li, H., Tan, W., & Wang, C. (2011). Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Molecular carcinogenesis*, *50*(2), 136-142.
- Xu, X., Tao, Y., Shan, L., Chen, R., Jiang, H., Qian, Z., Cai, F., Ma, L., & Yu, Y. (2018). The Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer*, *9*(19), 3557-3569. <https://doi.org/10.7150/jca.26350>
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., Fu, L., Song, M., Chen, P., Gao, W., Ren, B., Sun, Y., Cai, T., Feng, X., Sui, J., & Li, W. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *elife*, *1*, e00049. <https://doi.org/10.7554/eLife.00049>
- Yang, F., Zhang, L., Huo, X. S., Yuan, J. H., Xu, D., Yuan, S. X., Zhu, N., Zhou, W. P., Yang, G. S., Wang, Y. Z., Shang, J. L., Gao, C. F., Zhang, F. R., Wang, F., & Sun, S. H. (2011). Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans. *Hepatology*, *54*(5), 1679-1689. <https://doi.org/10.1002/hep.24563>
- Yang, H. I., Lu, S. N., Liaw, Y. F., You, S. L., Sun, C. A., Wang, L. Y., Hsiao, C. K., Chen, P. J., Chen, D. S., & Chen, C. J. (2002). Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, *347*(3), 168-174. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013215>

- Yang, H. I., Sherman, M., Su, J., Chen, P. J., Liaw, Y. F., Iloeje, U. H., & Chen, C. J. (2010). Nomograms for risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Oncol*, 28(14), 2437-2444. <https://doi.org/10.1200/jco.2009.27.4456>
- Yang, J., Sheng, Y. Y., Wei, J. W., Gao, X. M., Zhu, Y., Jia, H. L., Dong, Q. Z., & Qin, L. X. (2018). MicroRNA-219-5p Promotes Tumor Growth and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Regulating Cadherin 1. *Biomed Res Int*, 2018, 4793971. <https://doi.org/10.1155/2018/4793971>
- Yang, J. D., Hainaut, P., Gores, G. J., Amadou, A., Plymoth, A., & Roberts, L. R. (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16(10), 589-604. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y>
- Yang, Z., Zhu, Q., Luo, K., & Zhou, Q. (2001). The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature*, 414(6861), 317.
- Yasui, K., Hashimoto, E., Komorizono, Y., Koike, K., Arii, S., Imai, Y., Shima, T., Kanbara, Y., Saibara, T., Mori, T., Kawata, S., Uto, H., Takami, S., Sumida, Y., Takamura, T., Kawanaka, M., & Okanoue, T. (2011). Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 9(5), 428-433; quiz e450. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2011.01.023>
- Ye, Y., Zhuang, J., Wang, G., He, S., Zhang, S., Wang, G., Ni, J., Wang, J., & Xia, W. (2018). MicroRNA-495 suppresses cell proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma by directly targeting insulin-like growth factor receptor-1. *Experimental and therapeutic medicine*, 15(1), 1150-1158.
- Yerukala Sathipati, S., & Ho, S.-Y. (2020). Novel miRNA signature for predicting the stage of hepatocellular carcinoma. *Scientific reports*, 10(1), 14452. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71324-z>
- Yoon, S. M., Lim, Y. S., Park, M. J., Kim, S. Y., Cho, B., Shim, J. H., Kim, K. M., Lee, H. C., Chung, Y. H., Lee, Y. S., Lee, S. G., Lee, Y. S., Park, J. H., & Kim, J. H. (2013). Stereotactic body radiation therapy as an alternative treatment for small hepatocellular carcinoma. *PloS one*, 8(11), e79854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079854>
- Young, T. L., Matsuda, T., & Cepko, C. L. (2005). The noncoding RNA taurine upregulated gene 1 is required for differentiation of the murine retina. *Curr Biol*, 15(6), 501-512. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.027>
- Yu, F., Zheng, J., Mao, Y., Dong, P., Lu, Z., Li, G., Guo, C., Liu, Z., & Fan, X. (2015). Long Non-coding RNA Growth Arrest-specific Transcript 5 (GAS5) Inhibits Liver Fibrogenesis through a Mechanism of Competing Endogenous RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 290(47), 28286-28298. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.683813>
- Yu, M. W., Yeh, S. H., Chen, P. J., Liaw, Y. F., Lin, C. L., Liu, C. J., Shih, W. L., Kao, J. H., Chen, D. S., & Chen, C. J. (2005). Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst*, 97(4), 265-272. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji043>

- Yu, N. C., Chaudhari, V., Raman, S. S., Lassman, C., Tong, M. J., Busuttill, R. W., & Lu, D. S. (2011). CT and MRI improve detection of hepatocellular carcinoma, compared with ultrasound alone, in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 9(2), 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2010.09.017>
- Yu, Y., & Hann, S. S. (2019). Novel Tumor Suppressor lncRNA Growth Arrest-Specific 5 (GAS5) In Human Cancer. *Onco Targets Ther*, 12, 8421-8436. <https://doi.org/10.2147/ott.S221305>
- Yuan, D., Chen, Y., Li, X., Li, J., Zhao, Y., Shen, J., Du, F., Kaboli, P. J., Li, M., Wu, X., Ji, H., Cho, C. H., Wen, Q., Li, W., Xiao, Z., & Chen, B. (2021). Long Non-Coding RNAs: Potential Biomarkers and Targets for Hepatocellular Carcinoma Therapy and Diagnosis. *Int J Biol Sci*, 17(1), 220-235. <https://doi.org/10.7150/ijbs.50730>
- Yuan, S. X., Yang, F., Yang, Y., Tao, Q. F., Zhang, J., Huang, G., Yang, Y., Wang, R. Y., Yang, S., Huo, X. S., Zhang, L., Wang, F., Sun, S. H., & Zhou, W. P. (2012). Long noncoding RNA associated with microvascular invasion in hepatocellular carcinoma promotes angiogenesis and serves as a predictor for hepatocellular carcinoma patients' poor recurrence-free survival after hepatectomy. *Hepatology*, 56(6), 2231-2241. <https://doi.org/10.1002/hep.25895>
- Zhang, D., Kaneda, M., Nakahama, K.-i., Arii, S., & Morita, I. (2007). Connexin 43 expression promotes malignancy of HuH7 hepatocellular carcinoma cells via the inhibition of cell-cell communication. *Cancer letters*, 252(2), 208-215.
- Zhang, L., Yang, F., Yuan, J. H., Yuan, S. X., Zhou, W. P., Huo, X. S., Xu, D., Bi, H. S., Wang, F., & Sun, S. H. (2013). Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 34(3), 577-586. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs381>
- Zhang, Z., Zhang, Y., Sun, X.-X., Ma, X., & Chen, Z.-N. (2015). microRNA-146a inhibits cancer metastasis by downregulating VEGF through dual pathways in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer*, 14(1), 1-15.
- Zhang, Z., Zhu, Z., Watabe, K., Zhang, X., Bai, C., Xu, M., Wu, F., & Mo, Y. Y. (2013). Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-21. *Cell Death Differ*, 20(11), 1558-1568. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.110>
- Zhao, L., Liu, W., Xiao, J., & Cao, B. (2015). The role of exosomes and “exosomal shuttle microRNA” in tumorigenesis and drug resistance. *Cancer letters*, 356(2), 339-346.
- Zhou, J., Yu, L., Gao, X., Hu, J., Wang, J., Dai, Z., Wang, J.-F., Zhang, Z., Lu, S., & Huang, X. (2011). Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, 29(36), 4781-4788.
- Zhu, J., Liu, S., Ye, F., Shen, Y., Tie, Y., Zhu, J., Jin, Y., Zheng, X., Wu, Y., & Fu, H. (2014). The long noncoding RNA expression profile of hepatocellular carcinoma identified by microarray analysis. *PloS one*, 9(7), e101707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101707>
- Zhu, J., Xu, C., Ruan, L., Wu, J., Li, Y., & Zhang, X. (2019). MicroRNA-146b Overexpression Promotes Human Bladder Cancer Invasion via Enhancing ETS2-Mediated mmp2

mRNA Transcription. *Mol Ther Nucleic Acids*, 16, 531-542.  
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.04.007>

Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J. C., & Llovet, J. M. (2015). Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 149(5), 1226-1239.e1224.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.061>

Zynger, D. L., Gupta, A., Luan, C., Chou, P. M., Yang, G.-Y., & Yang, X. J. (2008). Expression of glypican 3 in hepatoblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases. *Human pathology*, 39(2), 224-230.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

Adı		Soyadı	
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu		Tel	

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans		

### İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1		
2		

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

## **10. BİLİMSEL FAALİYETLER**

## 11. EKLER