ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI IRAKLI BÖBREK YETMEZLİĞİ HASTALARINDA MİCRORNA 135A'NIN MOLEKÜLER TESPİTİ VE HCV'NİN BAZI İMMÜNOLOJİK BELİRTEÇLERİNİN TAHMİNİ

Wahbi Abdulrazzaq Sarhad SARHAD

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Wahbi Abdulrazzaq Sarhad SARHAD tarafından hazırlanan **"Bazı Iraklı Böbrek Yetmezliği Hastalarında MicroRNA 135a'nın Moleküler Tespiti ve HCV'nin Bazı İmmünolojik Belirteçlerinin Tahmini"** adlı tez çalışması 21/02/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Eş Danışman : Prof. Dr. Amina Namma AL-THWANI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İlkay Çorak Öcal
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aysel SARI
Kimya Anabilim Dalı
Fırat Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"Bazı Iraklı Böbrek Yetmezliği Hastalarında MicroRNA 135a'nın Moleküler Tespiti ve HCV'nin Bazı İmmünolojik Belirteçlerinin Tahmini"** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (21/02/2022).

Wahbi Abdulrazzaq Sarhad SARHAD

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI IRAKLI BÖBREK YETMEZLİĞİ HASTALARINDA MİCRORNA 135A'NIN MOLEKÜLER TESPİTİ VE HCV'NİN BAZI İMMÜNOLOJİK BELİRTEÇLERİNİN TAHMİNİ

Wahbi Abdulrazzaq Sarhad SARHAD

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bilyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Eş Danışman: Prof. Dr. Amina Namma AL-THWANI

Hepatit C virüsü (HCV), karaciğer hücrelerinde ciddi hasara neden olan bulaşıcı bir enfeksiyondur. Bu virüsler kan nakli, küçük ve büyük ameliyatlar, cinsel temas yoluyla ve diyaliz hastaları tarafından bulaşır. Hemodiyaliz hastalarının sık kan transfüzyonu yapmaları nedeniyle, sürekli hemodiyalizin yanı sıra HCV'ye maruz kalabilmekte ve bu da acılarını artırmaktadır. Son yıllarda Ramadi Hastanesi/Irak'ta diyaliz hastalarında HCV enfeksiyon sayısında artış gözlenmiştir. Çalışmamızda belirlenen gruplara moleküler ve immünolojik testler uygulanmıştır. Çalışma dört gruba ve her grupda cins ve yaşa göre ayrılmıştır. Bu çalışmaya dahil edilen HCV hasta sayısı 198 olarak belirlenmiştir. Enfekte bireylerde HCV'nin varlığını ve etkinliğini tespit etmek için RT.qPCR teknolojisi kullanılmıştır. Tüm çalışma gruplarında IL-17F genini izole etmek ve ölçmek için RT.qPCR teknolojisi kullanılmıştır. Buna göre, HCV ile enfekte olmuş diyaliz hastaları grubu (grup 1), HCV ile enfekte grup (grup 2) için gen ekspresyonu olduşurken, hepatit olmayan hemodiyaliz hastaları (grup 4), sağlıklı deneklerde (grup 3) IL-17F gen ekspresyonu tespit edilmemiştir. MikroRNA 135a'nın gerçek zamanlı qPCR'si böbrek yetmezliği olan (diyaliz) ve HCV ile enfekte olan (grup 1) hastalara uygulanmıştır. Bu hastaların 30%'unda gen ekspresyonu oluşumu gözlemlenmiştir. Viral enfeksiyonda bazı immün belirteçlerin önemli rolü bulunmaktadır. IL-17F ve TRL3 tüm çalışma grupları için ELISA ile test edilmiştir. Grup 1'de, grup 4 ve 2'ye göre yüksek konsantrasyonlar bulunurken, grup-3 konsantrasyonları çok düşük bulunmuştur. TRL3 konsantrasyonlarında ise sırasıyla grup 4, grup 1 ve grup 2'de artış görülürken, grup-3'te bulunan (sağlıklı insanlar) konsantrasyon diğer gruplara göre daha düşük olarak tespit edilmiştir.

2022, 82 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Böbrek yetmezliği, HCV, RT.PCR, IL-17F, TLR3, miR-135a

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR DETECTION OF MICRORNA 135A AND ESTIMATION OF SOME IMMUNOLOGICAL MARKER OF HCV IN SOME IRAQI PATIENTS OF RENAL FAILURE

Wahbi Abdulrazzaq Sarhad SARHAD

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Co-Advisor: Prof. Dr. Amina Namma AL-THWANI

The hepatitis C virus (HCV) is a contagious infection that causes severe damage to liver cells. These viruses are transmitted through blood transfusions, minor and major surgeries, sexual contact and by dialysis patients. Because hemodialysis patients have frequent blood transfusions, they can be exposed to HCV alongside continuous hemodialysis, which increases their suffering. In recent years, an increase in the number of HCV infections has been observed in dialysis patients in Ramadi Hospital/Iraq. Molecular and immunological tests were applied to the groups determined in our study. The study was divided into four groups and each group according to gender and age. The number of HCV patients included in this study was determined as 198. RT.qPCR technology was used to detect the presence and efficacy of HCV in infected individuals. RT.qPCR technology was used to isolate and quantify the IL-17F gene in all study groups. Accordingly, gene expression was found for HCV-infected dialysis patients (group 1) and HCV-infected group (group 2), whereas IL-17F gene expression was not detected in non-hepatitis hemodialysis patients (group 4) and healthy subjects (group 3). . Real-time qPCR of microRNA 135a was performed on patients with renal failure (dialysis) and HCV-infected (group 1). Gene expression formation was observed in 30% of these patients. Some immune markers have an important role in viral infection. IL-17F and TRL3 were tested by ELISA for all study groups. While higher concentrations were found in group 1 compared to groups 4 and 2, group-3 concentrations were found to be very low. While an increase was observed in TRL3 concentrations in group 4, group 1 and group 2, respectively, the concentration in group-3 (healthy people) was found to be lower than the other groups.

2022, 82 pages

Keywords: Renal failure, HCV, RT.PCR, IL-17F, TLR3, miR-135a

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Araştırma projeme devam etmemi sağlayan, doğru ve başarılı yolu seçmeme yardımcı olan danışmanım Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK'e en derin teşekkür ve takdirlerimi sunarım.

Sayesinde başarılı olduğum Eş Danışman Prof. Dr. Amina Namma AL-THWANI'ya araştırma hazırlık sürecindeki büyük ve sürekli desteği için de çok teşekkür ederim.

Çankırı Karatekin Üniversitesi'ndeki tüm öğretim üyelerine çeşitli disiplinlerdeki Iraklı öğrencileri destekledikleri için çok teşekkür ederim. En zor durumlarda desteğini esirgemeyen eşime ve bilim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, Ramadi Hastanesi diyaliz ünitesindeki çalışanlarına da, beni cesaretlendirdikleri ve ihtiyacım olan tüm bilgileri sağladıkları ve çalışmalarım için uygun bir yer sağlama konusunda yardım ettikleri için çok teşekkür ederim.

Wahbi Abdulrazzaq Sarhad SARHAD
Çankırı, Şubat 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR TARAMASI **3**
2.1 Hepatit C Virüsü **3**
2.2 HCV'nin Tarihçesi **3**
2.3 HCV'nin Sınıflandırılması **4**
2.4 Viroloji **5**
2.4.1 HCV yapısı **5**
2.4.2 Viral protein **8**
2.4.3 HCV yaşam döngüsü **14**
2.5 HCV İletimi **18**
2.6 HCV Epidemiyolojisi ve Genotipi **19**
2.6.1 Epidemiyolojisi **19**
2.6.2 HCV genotipleme **19**
2.7 HCV Doğal Geçmişi **22**
2.7.1 HCV'ye maruz kalmış ama enfekte olmamış kişiler **22**
2.7.2 Akut HCV enfeksiyonu **23**
2.7.3 Kronik HCV enfeksiyonu **23**
2.7.4 HCV enfeksiyonunun komplikasyonları **24**
2.8 HCV Laboratuvar Teşhisi **25**
2.8.1 Hızlı HCV immünoassay antikor testi **25**
2.8.2 Serolojik testler **25**
2.8.3 Hepatit C virüsü için moleküler tanı teknikleri **26**

2.9 Hepatit C Virüsünün Bağışıklığı 28
2.9.1 Bağışıklığın tanımı 28
2.9.2 Bağışıklık türleri 28
2.9.3 İnterlökin-17 (IL-17) 31
2.9.4 Toll-benzeri reseptör (TLR) 33
2.10 MikroRNA ve MikroRNA 135a 35
2.10.1 MikroRNA (miRNA) 35
2.10.2 MikroRNA 135a 36
2.11 Böbrek Hastalıkları 37
3. MATERYAL VE METOT 38
3.1 Materyal 38
3.1.1 Laboratuvar ekipmanları 38
3.1.2 Kimyasal malzemeler 39
3.1.3 Kit 39
3.1.4 Primerler 41
3.2 Örnek Toplama Yöntemi 41
3.2.1 Çalışma grupları 41
3.2.2 Kan örneği toplama 42
3.2.3 Çalışma tasarımı 44
3.3 Çalışma Yöntemleri 45
3.3.1 ELISA ile anti-HCV Ab'nin İncelenmesi 45
3.3.2 İnsan interlökin 17F'nin (IL-17F) ELISA ile incelenmesi 46
3.3.3 ELISA'ya göre insan benzeri reseptör 3 (TLR3) 46
3.3.4 HCV için gerçek zamanlı PCR testi 47
3.3.5 RNA izolasyonu 49
3.3.6 IL-17F için gerçek zamanlı PCR 51
3.3.7 miRNA 135a için RT-qPCR protokolü 53
3.4 İstatistik 54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 55
4.1 ELISA ile HCV Antikor Testi Sonuçları 55
4.2 HCV için Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizinin Sonuçları 55
4.3 MicroRNA 135a için Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizinin Sonuçları 57

4.4 IL-17F için Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizinin Sonuçları 58
4.5 ELISA ile TLR-3 Analizinin Sonuçları 59
4.6 ELISA ile IL-17F Analizinin Sonuçları 61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 62
KAYNAKLAR 63
EKLER 77
ÖZGEÇMİŞ 82

SİMGELER DİZİNİ

bp	Baz çifti
°C	Santigrat derece
gr	Gram
Kb	Kilobaz
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
p	Olasılık
pmol	Pikomol
rpm	Dakikada devir
µL	Mikrolitre

KISALTMALAR DİZİNİ

ARFP	Alternatif okuma çerçevesi proteini
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit
CSF2	Koloni – uyarıcı faktör 2
DGAT1	Diasilgliserol o-asiltransferaz – 1
ESLD	Son dönem karaciğer hastalığı
GT	Genotip
GM-CSF	Granülosit-makrofaj kolonisi – uyarıcı faktör
GTP	Guanosin-5'-trifosfat
HSPG	Heparin sülfat proteoglikanlar
HCV	Hepatit C virüsü
HCC	Hepatoselüler karsinoma
IL-17F	İnterlökin – 17F
ICTV	Uluslararasi Virüs Taksonomisi Komitesi
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MiRNA	Mikro ribonükleik asit
microRNA	Mikro ribonükleik asit
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler modeller
RT.PCR	Gerçek zamanli polimeraz zincir reaksiyonu
RT.qPCR	Gerçek zamanli kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RIG-I	Retinoik asit indüklenebilir gen-I
SRB1	Çöpçü reseptörü b1
ssRNA	Tek zincirli RNA
SVR	Sürekli virolojik yanıt
TLR3	Toll benzeri reseptör 3
TTV	Transfüzyon bulaşan virüs
TGN	Trans-golgi ağı
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 HCV genomu için tam açık okuma çereçevesi (Kato 2000) 8
Şekil 2.2 HCV molekül yapısı (Op De Beeck and Dubuisson 2003) 10
Şekil 2.3 IL-17F ailesi ligandları ve reseptörleri (Martin *et al.* 2013) 32
Şekil 2.4 IL-17F geni (Huret *et al.* 2012) 33
Şekil 2.5 İnsan TRL3 ECD'sinin genel yapısı (Choe *et al.* 2005) 35
Şekil 2.6 MiRNA biyogenez yolu (Terrinoni *et al.* 2019) 36
Şekil 3.1 Kan serumu örnek toplama şeması 42
Şekil 3.2 Kan toplama şeması 43
Şekil 3.3 Tasarımı çalışma şeması 44
Şekil 3.4 Qubit 4 ile nükleik asit ölçümü için stadart prosedür 51
Şekil 3.5 Livak formülü 53
Şekil 4.1 HCV için Gerçek Zamanlı kantitatif PCR analizinin sonuçları 57
Şekil 4.2 mikroRNA-135a için gerçek zamanlı kantitatif PCR sonuçları 58
Şekil 4.3 IL-17F için gerçek zamanlı kantitatif PCR analizinin sonuçları 59
Şekil 4.4 TLR3 için ELISA analizinin sonuçları 60
Şekil 4.5 IL-17F için ELISA analizinin sonuçları 61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 HCV proteinleri ve işlevleri ile moleküler ağırlıkları 9
Çizelge 2.2 HCV alt tipleri ile doğrulanmış genotipler 20
Çizelge 2.3 Hastalık türüne göre moleküler test (PCR) sonuçlarını açıklanması 27
Çizelge 2.4 TLR'ler tarafından PAMP tespiti 34
Çizelge 3.1 Kullanılan araç ve gereçler 38
Çizelge 3.2 Menşei ile kullanılan kimyasallar 39
Çizelge 3.4 Primerlerin adı ve onu kaynakları 41
Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan gruplar 42
Çizelge 3.6 PCR'ye eklenen PCR reaksiyon hacimleri dahili kontrolü 48
Çizelge 3.7 PCR Programı 49
Çizelge 3.8 Reaksiyon karışımının bileşenleri 52
Çizelge 3.9 Gerçek Zamanlı PCR için ısı döngüleyici protokolü 53
Çizelge 4.1 Grup dağıtımı 55
Çizelge 4.2 HCV için gerçek zamanlı kantitatif PCR analiz sonuçları 56
Çizelge 4.3 mikroRNA-135a için gen ekspresyonu sonuçları 58
Çizelge 4.4 IL-17F için gerçek zamanlı kantitatif PCR analiz sonuçları 59
Çizelge 4.5 TLR3 için tanımlayıcı istatistikleri 60
Çizelge 4.6 IL-17F için tanımlayıcı istatistikleri 61

1. GİRİŞ

Karaciğer çeşitli viral enfeksiyonlara maruz kalan bir organdır. Hepatit C virüsü (HCV) karaciğeri etkileyen en önemli virüslerden biridir ve bu virüs bir RNA virüsüdür (Brooks *et al.* 2001). Hepatit virüslerinden; Hepatit A virüsü (HAV), Hepatit B virüsü (HBV), Hepatit C virüsü (HCV), Hepatit D virüsü (HDV), Hepatit E virüsü (HEV) ve Hepatit G virüsü (HGV) türleri karaciğer hücrelerine zarar veren ve bulaşıcı hastalıklar yaaratan virüslerdir. Bunların bazıları karaciğer sirozuna hatta ölümle sonuçlanan karaciğer yetmezliğine yol açabilmektedir (Mahmoud *et al.* 2018).

Viral hepatit ayrıca karaciğer hücrelerinde önemli hasara neden olan bulaşıcı bir enfeksiyon olarak kabul edilmektedir. Bu virüsler (HAV ve HEV hariç) kan nakli ve diyaliz hastaları yoluyla bulaştığı için küresel bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Ayrıca küçük ve büyük ameliyatlar, cinsel temas yoluyla ve uyuşturucu kullanıcıları (kullanıcılar arasında aynı şırıngaların kullanılması sonucu) ve ayrıca dövme sahipleri ile HAV ve HEV virüslerinde olduğu gibi, kontamine yiyecek ve içecekler yoluyla (özellikle çocukları enfekte eder) enfeksiyon yayılır. HCV, 1989 yılında keşfedilmiştir (Greenwood *et al.* 2007). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) raporlarına göre dünya genelinde sessiz salgın olarak adlandırılan bu virüsle enfekte olmuş 71 milyondan fazla insan bulunmaktadır. Virüs insan vücuduna girdikten sonra, enfekte kişi herhangi bir hastalık belirtisi göstermez. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'ne (CDC) göre, enfekte olmuş kişilerin %80'i akut durumda olmasına rağmen bulgular mevcut değildir. Ayrıca enfekte olmuş kişilerin %70-80'i kronik bir enfeksiyona sahip olup bunların %20 - 30'u hastalıktan rahat bir şekilde kurtulabilir. Ancak hastanın %3 - 11'inde ileri yıllarda, karaciğer sirozu, hepatoselüler karsinom (HCC) veya ölüme yol açan karaciğer yetmezliği meydana gelebilir (Gacche and Al-Mohani 2012).

HCV, *Flaviviridae* familyasına aittir. Bu virüs küçük (40-60 nm) olması ve ssRNA bandından oluşması ile karakterize edilmektedir. Bu virüsün ayrıca 8 genotipi ve yaklaşık 120 alt tipi bulunmaktadır (Irshad *et al.* 2010).

Böbrek yetmezliği olan hastalar, 3-5 saatlik bir süre boyunca haftada 2-3 kez diyalize ihtiyaç duyarlar. Bu hastalara ayrıca sürekli kan transfüzyonu gerekir ve bu durum onları HCV enfeksiyonuna karşı savunmasız hale getirmektedir. Dolayısıyla HCV ile böbrek yetmezliği (diyaliz) olan hastalar arasında bir ilişki vardır ve diyaliz hastalarında bu hastalığın yayılma hızı yüksektir. Ancak, vakaların %30 - %40'ında belirgin bulaşım yolları tespit edilememiştir (Hassan *et al.* 2018).

HCV, konak hücrenin yüzeyinde bulunan Toll benzeri bir reseptör (özellikle TLR3) yoluyla konakçı hücreye girer. Virüs kendi nükleik asitlerini üretmek için temiz hücreyi kullanmaktadır. Konağın vücuduna girdikten sonra, IL-17 ailesi gibi interlökinleri içeren sitokinler uyarılır. IL-17F dahil olmak üzere IL-17 ailesinin altı üyesi vardır (Wu *et al.* 2017). Bu sitokinler, viral enfeksiyonlarda olduğu kadar konak savunmasında ve inflamatuar bozukluklarda da önemli düzenleyicilerdir (Jin and Dong 2013).

Kronik HCV, uzun vadede siroz veya HCC'ye neden olur. IL-17F konsantrasyonları, şiddetli fibrotik evreleri olan HCV hastalarında ve HCC dokularında önemli ölçüde yükselir (Wu *et al.* 2017). Birkaç hücresel miRNA, özellikle miR-135a, insanlarda kansere bağlı bir miRNA ve HCV enfeksiyonu ile bağlantılı olup viral hepatitin neden olduğu karaciğer kanserine katkıda bulunmaktadır (Sodroski *et al.* 2019). Virüsün belirlenmesi, nükleik asitlerinin nicel ve nitel olarak tespit edilmesi ve hızlı moleküler biyolojik testler ile sağlanmaktadır. Bu sayede, HCV'nin varlığının neden olduğu doğuştan gelen bağışıklık bileşenleri de kesin olarak teşhis edilmiş olur..

Bu çalışmanın amacı, böbrek yetmezliği olan bazı hastalarda hepatit C virüsünün moleküler tespiti ve bunun miRNA-135a ve IL-17F ve TLR3 gibi bazı immünolojik belirteçlerle ilişkisinin belirlenmesidir.

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Hepatit C Virüsü

Hepatit, bilinen en eski hastalıklardan biridir. Hepatit tek bir hastalık değil, hepatositlerin ve karaciğerin iltihaplanması anlamına gelen bir terimdir. Hücre metabolizmasında önemli bir rol oynar ve çeşitli viral enfeksiyonlardan etkilenebilir. Hepatite neden olan virüsler, insan Sitomegalovirüs gibi karaciğer hücrelerinde çoğalan ve dolaylı olarak hepatite neden olan birincil lipotropik virüsler ile hepatit (A), (B), (C), (D), (E), (G) ve transfüzyon ile bulaşan TTV virüsü gibi ikincil lipotropik virüsler olarak iki kısma ayrılmaktadır. Bu virüsler farklı viral ailelere aittir ve bulaşma biçimleri, epidemiyolojileri ve patojeniteleri bakımından farklılık gösterirler. Fakat klinik olarak bir paterni diğerinden ayırt etmek mümkün değildir. Hepatite neden olan virüslerin yanı sıra bakteri, mantar, parazit gibi farklı etkenler ile ilaçlar, toksinler ve alkol gibi kimyasal ajanlar da bulunmaktadır (Mahmoud *et al.* 2018).

HCV, başlıca insan patojenlerinden biridir ve dünya çapında yaklaşık 71 milyon insanı etkilemektedir. Oldukça güçlü ve doğrudan etkili antiviral ajanların ortaya çıkışı ile yapılan tedavilerde HCV büyük ölçüde iyileştirmiş olsa da, şu anda HCV'ye karşı koruyucu bir aşı bulunmamaktadır ve bu da HCV'nin küresel eradikasyonunu zorlaştırmaktadır (Ogden *et al.* 2015).

2.2 HCV'nin Tarihçesi

HCV, diğer hepatit virüslerinden farklı olan ve hepatit A virüsü (HAV) veya hepatit B virüsü (HBV) gibi teşhis edilmemiş enfeksiyonlardan sorumlu bir virüstür olup genellikle asemptomatiktir ve bu süre boyunca tespit edilmesi zordur (Alter *et al.* 1975).

İngiltere'de yapılan bir araştırma, bu virüsün epidemiyolojisinin HBV'ninkine yakın olduğunu ortaya koymuştur (Farrow *et al.* 1981). 1989 yılına kadar, hepatit hastaları negatif taramaya sahipse Hepatit A- Hepatit B olmayan (NANB hepatit) taşıyıcıları

olarak kabul edilmişlerdir (Tarish *et al.* 2014). İlk NANB antikor saptama testi, Kaliforniya'daki Chiron Diagnostics tarafından Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) ile işbirliği içinde, adsorban yöntemi ile Enzim Bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) kullanılarak geliştirilmiştir (Kao and Chen 2000).

İlk başta bu virüsü tanımlamak zor olmuştur. Ancak rekombinant DNA'nın ortaya çıkmasıyla NANB virüs genomunu klonlamak mümkün olmuş ve daha sonra virüs HCV olarak adlandırılmıştır (Choo *et al.* 1989). O zamandan beri nükleik asit teknolojisindeki gelişmeler sayesinde çalışmalar devam etmiş ve HCV çeşitli nedenlerle inceleme konusu olmuştur. Bunlardan ilki, kronik hepatit enfeksiyonlarının dünya çapında çok yaygındır olması olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğeri, mevcut tedavilerin az oranda olmasıyla bağlantılı olarak interferon-alfa ve ribavirin kullanımına bağlıdır. Bu tedavi, küçük bir oranda hastaların yaklaşık %40'ı için faydalıdır ve hastalığı önleyici bir aşının geliştirilmesi olası bir fırsattır. Bu virüse genellikle 'Sessiz Virüs' denir (Racanelli and Rehermann 2003).

2.3 HCV'nin Sınıflandırılması

Hepatit C virüs, *Hepacivirus* cinsine ait olup *Flaviviridae* familyasının bir üyesidir. Bu virüs köpek karaciğerinde bulunana kadar bu cinsin tek üyesi olarak kabul edilmiştir (Kapoor *et al.* 2011). Ayrıca bu cinsin atlara bulaşan bir cinside bulunmaktadır (Burbelo *et al.* 2012). Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesine göre Hepatit virüs kategorisi aşağıdaki şekilde sınıflandırılır (Brinton *et al.* 2021).

Alem: *Riboviria*
Şube: *İncertae sedis*
Familya: *Flaviviridae*
Cins: *Hepacivirüs*
Tür: Hepatit C Virüsü (HCV)

2.4 Viroloji

2.4.1 HCV yapısı

HCV molekülleri, 55-65 nm kalınlığında lipid kılıfla çevrili RNA'dan oluşmaktadır (Dubuisson and Cosset 2014). Bu virüs, Lipid zarf içinde iki viral kapsüllenmiş glikoprotein olan E1 ve E2 içermektedir bu glikoproteinler virüsün hücreye girmesinde rol oynamaktadır (Op De Beeck and Dubuisson 2003). Ayrıca, virüs zarf yapısının içinde, çapı 33 - 40 nanometre arasında olan on yüzlü bir çekirdek, çekirdeğin içinde de virüsün RNA'sı bulunmaktadır (Dubuisson and Cosset 2014, Kaito *et al.* 2006).

2.4.1.1 Sağlıklı viryon

HCV cinsi *Flaviviridae* ailesine ait zarflı, pozitif zincirli bir RNA virüsüdür. *Flaviviridae* ailesinde, Sarı Humma virüsü, Batı Nil virüsü ve Dang virüsünü bulunmaktadır. HCV partikülleri yuvarlaktır ve boyutları farklıdır, çapları 40-80 nm arasında değişmektedir. Şu anda 8 genotip ve 90 HCV alt tipi bulunmaktadır (Yost *et al.* 2018).

2.4.1.2 Kesit viryonu

HCV, çapı 40-80 nm olan küresel, heterojen bir partiküldür. HCV partikülünün enine kesit görünümlerinde, kapsüllenmiş glikoproteinler (E1 ve E2 heterodimerleri), lipit membran, nükleokapsid ve tek zincirli RNA genomunun tümü görülebilmektedir (Vieyres *et al.* 2014).

2.4.1.3 HCV zarfı

Virüsün lipid zarfı, konağın zarından oluşur ve iki tip protein içermektedir. Bu proteinler heterojen yapıyı oluşturan E1 ve E2 glikoproteinlerinin zarflarıdır (Lavie *et al.* 2006). HCV molekülleri lipitlere ve proteinlere benzersiz bir şekilde bağlıdır. Bu bağlantılar,

salgılanan virüslerin sentezinde ve işlevinde rol oynar ve viral partiküllere daha düşük kaldırma yoğunluğu vermektedir (Yost *et al.* 2018). E1 ve E2 glikoproteinleri; heterodin, membranöz için konakçı hücre reseptörünü tanıyarak virüsün konakçıya girmesinden sorumludur. Glikozaminoglikanlar ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörleri yoluyla konakçının hücre reseptörü ile ilk virüs bağlanma etkileşimleri gerçekleşir. Claudin-1, okludin, CD81 ve SR'ler tarafından E1'in önemi bilinmemektedir. E2 çok önemli bir işlevi olan reseptörler arasında bulunmaktadır. E1 ve E2 virüsün yüzeyinde mevcut olduğundan ve konakçı immün tanıma için çok önemli olduğundan dolayı aşı araştırmalarında önemli rol oynamaktadırlar. Virüs oluşumu, konak hücre bağlanması ve membran füzyonunun çeşitli aşamaları sırasında, heterodimer E1 ve E2'nin oluşturulması ve bunların etkileşimleri ayrıntılı olarak tanımlanmamıştır (Helle *et al.* 2008).

2.4.1.4 Lipid zarı

HCV lipid zarı; kolesterol, kolesterol esterleri, fosfatidilkolin ve sfingomiyelin'den oluşmaktadır. HCV molekülü, konağın hücre zarlarının aksine, önemli miktarda kolesterol içerir. HCV zarında ayrıca çok düşük yoğunluklu lipoproteine (VLDL) benzer bir yapı veren kolesterol bulunmaktadır. HCV membranları, onları diğer virüslerden ve konakçı hücrelerden ayıran belirgin bir lipid yüzdesine sahiptir (Aizaki *et al.* 2008).

2.4.1.5 Kapsid

HCV, RNA'yı kaplayan ve koruyan, birincil protein tabakalı kapsidtir. Viral membranla etkileşime giren proteinler, çekirdeğin çoklu HCV-RNA segmentlerine bağlanan dış yüzeyinde bulunmaktadır. Polipeptit parçalandıktan sonra, temel proteinler bir kapsid oluşturmak üzere endoplazmik retikulumun sitoplazmik cephesinde toplanmaktadır. Daha sonra, HCV-RNA ve E1 proteinleri tarafından tetiklenmektedir. Oluşum aşamasında, HCV-RNA çekirdek proteinlerinin bağlandığı ve çevrelediği bir yapı görevi görmektedir. Yaklaşık 30 nm çapında olan HCV'nin kapsidi küreseldir ve boyut olarak çeşitlilik göstermektedir (Gawlik and Gallay 2014).

2.4.1.6 Nükleokapsid

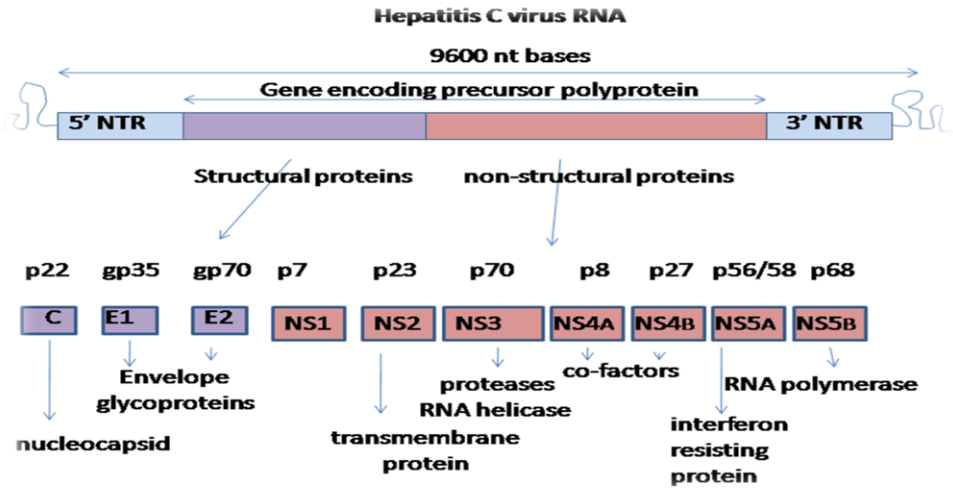
HCV nükleokapsidinde, hem HCV kapsidi hem de HCV-RNA bulunmaktadır. HCV ana proteinleri, HCV-RNA'yı koruyan kapsidi oluşturmaktadır. HCV-RNA, yaklaşık 9600 nükleotid uzunluğunda, pozitif anlamda, tek zincirli bir RNA'dır. HCV-RNA'nın belirli bölümleri kapsid yapısına bağlıdır. Yaklaşık 30 nm çapındaki HCV nükleokapsidi küreseldir ve boyut olarak heterojendir (Gawlik and Gallay 2014).

2.4.1.7 HCV genom organizasyonu

HCV, yaklaşık 4900 nitrojen bazı içeren ve 9,6 kb uzunluğunda polar pozitif iplikli RNA'dan oluşmaktadır. Amino asitler, viral genomun nükleotidlerinin yüzde 98'ini oluşturur. Bu çerçeve her iki uçta UTR-'5 ve UTR-'3 translasyon geçirmemiş bölgelerle çevrilidir (Şekil 2.1) (Dunaeva and Esaulenko 2006). UTR-5 'translasyon geçirmemiş bölgesi, İntra Ribozomal Giriş Bölgesi (IRES) olarak adlandırılan bir bölgeye bağlı bir ribozom içeren yaklaşık 341 nükleotitten oluşmaktadır. Ayrıca bu bölge, çekirdeğin yapısal bileşenlerini içeren 10 yapısal proteini kodlar ve bu kaplama proteinlerinden ikisi E1 ve E2'dir. E2 proteini, spesifik antikorların (virüse özgü antikorlar) neden olduğuna inanılan yüksek düzeyde mutasyonlar içeren bölgeler arasında bulunmaktadır. Bu bölgeler, değişken bölgeler 1 ve oldukça değişken bölgeler 2 olarak bilinen iki ayrı kısıma ayrılmaktadır.

E2, hepatositler üzerinde bir reseptör olan CD-81'e bağlanacak bir bölge ve hepatit C virüsü için birincil reseptöre bağlanan B lenfositleri içermektedir. Yapısal olmayan proteinler NS2, NS3, NS4A, NS4B ve NS5A'yı bulundurur. NS5B ve P7 proteinleri, heliaz, proteazlar ve bağımlı RNA polimerazı meydana getirmektedir. Ancak proteinin tam işlevi P7 için henüz bilinmemektedir (Kevin *et al.* 2010). Viral genom ayrıca, ARF adı verilen birincil bölgesi tarafından kodlanan ve F proteini (çekirdek +1 proteini) olarak da bilinen bir viral protein türü olan alternatif okuma çerçevesi proteinini (ARFP) içermektedir (Şekil 2.1). Bu protein 124 kodon içerir, ancak virüsün tüm genotiplerinde mevcut olduğuna inanıldığı için bir başlangıç kodonu (AUG) yoktur ve konak hücre ile

çekirdek tarafından uyarılan virüs arasındaki etkileşimlerden sorumludur (Kochlios *et al.* 2012).



Şekil 2.1 HCV genomu için tam açık okuma çereçevesi (Kato 2000)

2.4.1.8 Lipoviral partiküller (LVP)

HCV, kan dolaşımı yoluyla yayılan hibrit bir lipovirüstür. Virüs, HCV partikülüne karmaşık bir şekilde bağlı olan lipoproteinlerden oluşur. Viral lipoproteinin bileşenleri arasında trigliseritler, HCV-RNA, kapsid proteini, E1 kapsüllü glikoprotein, E2 kapsüllü glikoprotein, lipoprotein B ve lipoprotein E bulunmaktadır. Bu lipid moleküllerinin çapı yaklaşık 100 nm'dir. Lipozomların oluşumu, HCV'nin hepatositlere daha kolay girmesini sağlar ve antikorlar tarafından nötralize edilmesini önler. Bu lipoproteinler, kan dolaşımındaki LDL'ler ve VLDL'ler ile aynı yoğunluğa sahiptir (Crouchet *et al.* 2017).

2.4.2 Viral protein

HCV, zarflı ve pozitif iplikli bir RNA genomuna sahip bir *Flaviviridae* virüsüdür. 9,6 kb HCV-RNA genomu, 3 yapısal proteine (çekirdek, E1 ve E2) ve translasyon sırasında veya sonrasında 7 yapısal olmayan protein (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) bölünen tek bir poliproteini kodlar (Li *et al.* 2015). E1 ve E2 zarf glikoproteinleri,

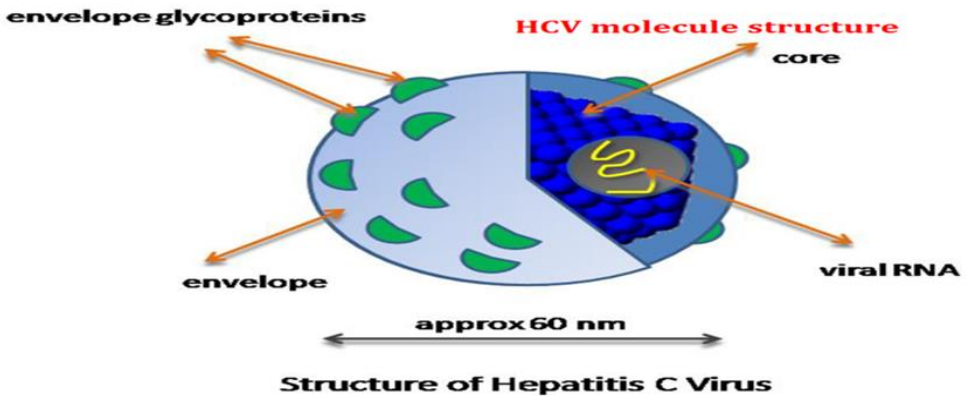
virüslerin girmesine ve dönüşmesine izin veren kararlı bir heterodimer oluşturur. HCV viryonları LDL'lere veya VLDL'lere bağlıdır. Virüs girişi, çıkışı ve bağışıklıktan kaçış bu proteinler tarafından kolaylaştırılır. HCV girişi ve morfogenez, bir dizi viral yapısal ve yapısal olmayan proteinin yanı sıra konakçı faktörleri içeren karmaşık süreçlerdir (Ding *et al.* 2014). HCV Çizelge 2.1'de gösterilen bir dizi proteinden oluşmaktadır.

Çizelge 2.1 HCV proteinleri ve işlevleri ile moleküler ağırlıkları (Mahmoud *et al.* 2018)

Protein	Moleküler ağırlık (KD)	Amino asit konum Referans dizini	Amino asit sayısı	İşlevi
Çekirdek protein	21	1-174	174	Kapsidin protein bileşeni, diğer bileşenlerin bağlanmasına ve korunmasına ek olarak çeviri, RNA replikasyonu, molekülleri toplamada düzenleyici işlevlere sahiptir.
F-protein	16 -17		126-161	Bilinmiyor
E1	35	192-383	192	Penetrasyonda, antifagositozda rol oynayan transfer zarlarında (Transmembran glikoprotein) önemli bir glikoproteindir.
E2	70	384-746	363	Viral zarftaki bir glikoprotein, penetrasyonda, anti-fagositozda da rol oynar.
P7	7	747-809	63	Enfeksiyöz virion moleküllerinin oluşumu için gerekli olan iç endoplazmik retikulumda (ER) bir iyon kanalı oluşturur.
NS2	21	810-1026	217	NS2 ve NS3 arasındaki protein öneklerinin bölünmesini uyarır.
NS3	70	1027-1657	631	Hepatit virüsünün son proteinini, asit mRNA'nın sentezi ve translasyonu yönü ile 3'e böler.
NS4A	4	1658-1711	54	NS3-NS4A proteaz için koenzim
NS4B	27	1712-1972	261	Virüsü kopyalamak ve DNA replikasyonunun membranöz ağ iç endoplazmik sürecini uyarmak kesinlikle gerekli ve çok önemlidir.
NS5A	56	1973-2420	448	IFN- α 'ya duyarlı spesifik bir bölge içeren çok işlevli bir fosfat proteini, interferon bağımlı tedaviye yanıt vermede önemli bir rol oynar.
NS5B	66	2421-3011	591	Virüsü çoğaltarakelde edilen gerekli polimeraz enzimi.

2.4.2.1 HCV'nin yapısal proteinleri

HCV'nin boyutu 55-65 nm olup zarflı, pozitif algılayıcı, tek zincirli RNA virüsüdür (Ray *et al.* 2009). Virüs partikülü, viral zarfın iki glikoproteininin (E1 ve E2) dahil edildiği hücresel kaynaklı bir lipid zarf içinde ek olarak kapsüllenmiş altı yüzlü proteinin koruyucu bir kabuğu ile çevrelenmiş RNA çekirdeğinden oluşmaktadır. HCV genomu, daha sonra, hücresel ve viral proteazlar tarafından 3 yapısal proteine (temel, E1, E2) ve 7 yapısal olmayan (NS) protein (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B) bölünen tek bir poliproteine translasyon edilmektedir (Penin *et al.* 2004). Serumdaki virüs parçacıklarının yarılanma ömrü yaklaşık üç saattir (Şekil 2.2). Virüs sadece karaciğerde değil aynı zamanda lenfositlerde de çoğalabilir (Zignego *et al.* 2012).



Şekil 2.2 HCV molekül yapısı (Op De Beeck and Dubuisson 2003)

Çekirdek proteini: (p22)

Hepatit C çekirdeği, insanlarda enfeksiyon teşhisi için önemli bir belirteçtir. Birincil dizisi, HCV proteinlerinin en çok korunan dizisidir, bu da onu HCV enfeksiyonu için en çok yönlü protein belirteci haline getirir. Enzim bağlantılı immünosorbent tahlili (ELISA), HCV enfeksiyonunun teşhisine yardımcı olarak HCcAg'nin klinik uygulamaya dayalı tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ross *et al.* 2010). HCcAg'nin, HCV-RNA'dan sadece 3-5 gün sonra ortaya çıkan enfeksiyondan 10-15 gün sonra kanda bulunduğuna dikkat edilmelidir. Bu nedenle HCcAg, HCV enfeksiyonunun erken teşhisi için yararlı bir belirteçtir. Hepatit C birincil antijeni viral bir proteindir.

Birincil antijen, HCV'nin bir parçası olduğu için, genellikle enfeksiyondan iki hafta sonra kan dolaşımında bulunabilmektedir (Soliman *et al.* 2015).

Envelope Glikoprotein E1 (gp35)

E1, iki zarf glikoproteinin alt biriminden biridir ve bunlar hepatit C virüsünde bulunmaktadır. Diğer alt birim ise E2'dir. Bu protein, yüksek oranda glikosile edilmiş bir N-terminal dış alanı ve bir hidrofobik terminal ankrajı olan tip 1 transmembran proteinidir. E1 glikoproteinleri sentezlendikten sonra, kovalent olmayan bir heterodimer olarak E2 glikoproteinine bağlanmaktadır (Lavie *et al.* 2006).

Zarf Glikoprotein E2 (gp70)

E2, hepatit C virüsünde bulunan viral yapısal bir proteindir. Viral zarf üzerinde bulunur ve konakçı hücrelere girişe aracılık eden bir konak reseptörüne bağlı bir protein görevi görür. Giriş inhibitörleri ve aşı bağışıklığı tasarlamak için önemli bir hedeftir (Kong *et al.* 2013).

2.4.2.2 HCV'nin yapısal olmayan proteinleri

Yapısal olmayan protein NS2 (p23)

Yapısal olmayan protein NS2, hepatit C virüsünde bulunan viral bir proteindir. Ayrıca influenza virüsleri tarafından üretilir ve nükleer ihracat proteini (NEP) olarak da bilinir. NS2, her biri pozitif RNA virüsünün karboksi ucunun yakınında kodlanmış, HCV'deki yedi yapısal olmayan proteinden biridir. Bir kez translasyon edildiğinde, 217 amino asitlik bir uzunluğa ve yaklaşık 23 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir. NS2, hidrofobik bir amino-terminal alt alanına ve aynı zamanda bir karboksi-terminal sitoplazmik alana sahiptir ve amino-terminal alt alanı üçe kadar varsayılan membran segmenti içermektedir (Lorenz 2010).

Yapısal olmayan protein NS3 (p70)

p70 olarak da bilinen NS3, HCV poliprotein bölünme ürünü olan 70 kDa'lık yapısal olmayan bir viral proteindir ve serin proteaz görevi görmektedir. C-terminal proteininin üçte ikisi aynı zamanda bir helikaz ve bir nükleozid trifosfataz görevi görür. NS3'ün ilk (N-terminali) 180 aminoasidi, NS2 proteini için kofaktör alanları olarak ek bir role sahiptir (Schregel *et al.* 2009).

NS3 proteini, serin proteaz ve RNA helikaz fonksiyonlarını gerçekleştiren zara bağlı çok işlevli bir proteindir. HCV tekrar kompleksinin önemli bir bileşenidir ve antiviral tedavi için potansiyel bir hedeftir. İki membran bağlanma belirleyicisi, HCV NS3-4A'nın membran bağlanmasını ve yapısal yukarı regülasyonunu sağlamak için birlikte çalışır. NS4A'nın N-terminal 21 amino asitlerinin bir α-sarmal zar oluşturması ve zar içi protein-protein etkileşimlerine katılması, işlevsel bir transkripsiyon kompleksinin düzeneği için gereklidir. Sonuç olarak, amfibi sarmalı 0'daki NS3 kalıntısı, NS3-4A membranına bağlı ikincil bir primer belirleyici olarak hizmet eder ve aktif serin proteininin membran üzerindeki konumunun uygun şekilde tanımlanmasını sağlar. Bu bulgular, NS3-4A membran bağlanması, manipülasyonu ve yapısal kontrolü için karmaşık bir modelin geliştirilmesine izin verir. Sonuç olarak, HCV replikasyon kompleksinin fonksiyonel yapısında, konak faktörlerinin proteinolitik hedeflenmesinde ve ilaç geliştirmede rol oynamaktadır (Brass *et al.* 2008).

Yapısal olmayan protein NS4A (p8)

NS4A, 54 amino asitli bir proteindir ve NS3 proteazın etkisi için gereklidir. NS4A'nın N-terminal alanı hidrofobiktir. NS4A'nın, NS3'ün endoplazmik retikulum hedeflemesi için gerekli olduğunu ortaya çıkarmıştır. NS5A'nın fosforilasyonu için NS4A'nın NS5A ile etkileşimi gerekmektedir (Egger *et al.* 2002). Ayrıca, HCV üremesinde hayati bir işlev görmektedir. NS4A, bazı hücresel fonksiyonlar üzerindeki etkisiyle viral hastalıkların patogenezine katkıda bulunur. NS4A, endoplazmik retikulum ve mitokondride tek başına veya NS3/4A poliproteini olarak NS3 ile kombinasyon halinde

bulunur. NS4, mitokondriyal dağılımı değiştirir ve konakçı hücrelerin apoptozisine yol açan hasara neden olmaktadır (Nomura *et al.* 2006).

Yapısal olmayan protein NS4B (p27)

Yapısal olmayan protein 4B (NS4B), hepatit C virüsünde bulunan viral bir proteindir. 27 kDa'lık bir kütleye sahiptir ve virüs replikasyonuna izin vermek için hücre içi zar yapısını oluşturma sürecinde yer alabilir. HCV yapısal olmayan protein 4B (NS4B) 27 kDa hidrofobik bir proteindir ve çeşitli viral aktivitelere ve konak hücreler üzerindeki etkilere aracılık etmede rolü olduğunu gösteren çalışmalar vardır. HCV karsinojenezi, endoplazmik retikulumun işlev bozukluğu ve viral ve konak translasyon kontrolünde rollerine ek olarak, NS4B, NS5B'de RNA'ya bağımlı RNA polimeraz aktivitesini modüle etmede yer almaktadır ve çeşitli konak sinyal iletim yollarında bir role sahiptir. NS4B'nin, virüs replikasyonu için platform görevi gören membran retikulumu olarak bilinen yeni bir hücre içi zar yapısının geliştirilmesinden sorumlu olduğu keşfedilmiştir. NS4B içindeki benzersiz etki alanları, önceki işlevlerin çoğuna aracılık etmek için NS4B tarafından kullanılan mekanizmaları desteklemek üzere kurulmuştur. Amfipatik sarmal ve nükleotid bağlama promotörü, yeni antiviral stratejiler için en umut verici hedeflerden ikisidir (He *et al.* 2006).

Yapısal olmayan protein NS5A (p56/p58)

Yapısal olmayan protein NS5A, prolin açısından zengin ve çinkoya bağlı hidrofilik bir fosfoproteindir ve hepatit C virüsü RNA'sının replikasyonunda önemli bir rol oynar. Transmembran spiralleri olmayan bulanık bir şekil gibi görünmektedir. HCV'nin yapısal olmayan proteini 5A, konakçı hücre ile çoklu etkileşimlerde yer alan yüksek oranda fosforile edilmiş bir moleküldür. Moleküler kütlelerine (kilodalton olarak), p56 ve p58'e göre NS5A'nın iki farklı fosforilasyonu tanımlanmıştır (He *et al.* 2006).

Yapısal olmayan protein NS5B (p66 – 68)

Yapısal olmayan protein NS5B, hepatit C virüsünde bulunan viral bir proteindir (Gehring *et al.* 2009). RNA replikasyonu sırasında rNTP polimeraz stimülasyonu için bir şablon olarak viral pozitif RNA zincirini kullanarak HCV'nin viral RNA'sını kopyalamanın ana işlevine sahip olan RNA'ya bağımlı bir RNA polimerazdır (Biswal *et al.* 2005).

Yapısal olmayan protein NS1 (p7)

Yapısal olmayan protein NS1, pozitif yüklü bir hidrofilik hücre halkasına bağlı bir zar boyunca iki parçayı katalize eden üç sarmaldan oluşan "saç tokası benzeri" bir topolojiden ve 63 amino asitten oluşan küçük bir proteindir (Foster *et al.* 2014). P7, IFN antiviral fonksiyonunu antagonize ederek bağışıklık kaçışını artırabilmektedir (Qi *et al.* 2017).

F protein

HCV-F proteini, ribozomal çerçeve kayması geçişi ile ifade edilen, yakın zamanda tanımlanmış bir gen ürünüdür. Bu proteinin biyolojik özellikleri büyük ölçüde bilinmemektedir. Etkilenen hepatositlerde F proteini, yarı ömrü 10 dakikadan az olan değiştirilebilir bir proteindir. Proteaz inhibitörleri, F proteininin yarı ömrünü büyük ölçüde artırabilir. F proteini büyük ölçüde endoplazmik retikulum ile bağlantılı olduğundan, HCV üretimi veya replikasyonunda rol oynayabilir (Xu *et al.* 2003).

2.4.3 HCV yaşam döngüsü

2.4.3.1 Bağlama

HCV'nin yaşam döngüsü, HCV'nin karaciğer LDL-reseptörü ve HSPG'lerin yüzeyindeki iki konakçı reseptöre düşük düzeyde bağlanmasıyla başlar. İlk tepki

sırasında, HCV, E1 ve E2 dış zar proteinleri, SRB1'e ve tetraspanin CD81 proteinine bağlanır. Bir lipid membran dalgasına, HCV partikülünü hepatositler arasında sınırlı bir alana iten bu proteinler arasındaki etkileşimler neden olmaktadır (Agnello *et al.* 1999).

2.4.3.2 Endositoz

HCV, claudin-1 (CLDN1) ile CD81 reaksiyonunun meydana geldiği dar bağlantıya girer ve viral partikülün klatrin ile kaplı çukur benzeri bir bölgede hepatosit membranı ile dahili olarak katlanmasına neden olur. Bu işlem sırasında, konak hücre zarı tarafından kaplanmış viral bir partikül olan bir endozom oluşturulur (Blanchard *et al.* 2006).

2.4.3.3. Füzyon ve soyunma

Endozomu çevreleyen klatrin kafesi, sitozol içindeki hepatosit içine girerken dağılır ve endozom vezikülünü boş bırakır. Endozom içindeki asit pH etkisinin sonucu, viral membranlar ve konakçı arasında füzyona yol açar ve buna endojen füzyon denir. Kapsid gevşemektedir ve HCV-RNA, translasyon ve replikasyon için sitozole salınmaktadır (Scheel and Rice 2013).

2.4.3.4 HCV'nin translasyonu

HCV-RNA genomu, konakçı hücrenin sitoplazmasında lokalizedir. Translasyon edilmemiş bölge 5'teki ((5 ′ UTR) dahili ribozom yerleştirme bölgesi (IRES) tarafından, Met-tRNAiMet'in ve birkaç ökaryotik ve GTP başlatma faktörünün 40S ile bağlanmasını gerektirir. Başlatma kodonuna ulaşmak için UTR 5' boyunca tarama yapılır. Kodlama bölgesinde replikasyon elementi (CRE) ve 3 UTR gibi alt elemanlar da yer almaktadır (Fraser and Doudna 2006).

2.4.3.5 Proteolitik işleme

Viral protein, endoplazmik retikulum içinde işlenir. Esansiyel proteinler E1, E2 ve p7 daha sonra hücresel proteazlar tarafından parçalanır. NS2 sistein proteini, NS3 proteininin N-terminali ile bağlandığında NS3'ün NS2 parçalanması gerçekleşmektedir. Son olarak, NS3 kalan proteinleri NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B parçalayan zara bağlı NS4A ile NS3-4A proteaz kompleksini oluşturarak yapısal ve yapısal olmayan proteinlerden oluşan on olgun HCV proteini meydana getirmektedir (Moradpour *et al.* 2007).

2.4.3.6 RNA replikasyonu

Hepatit C'nin tekrarlaması birkaç adımdan oluşmaktadır. Virüs esas olarak hepatositlerde çoğalır ve enfekte olmuş her hücrenin yaklaşık elli virüs (viral partikül) ürettiği tahmin edilmektedir. Bu durum yaklaşık olarak bir trilyon virionun translasyonu anlamına gelmektedir. Virüs ayrıca kronik HCV hastalarında görülen yüksek bağışıklık yetersizliklerinden sorumlu olan periferik kan mononükleer hücrelerinde çoğalır. HCV partikülleri, karaciğer hücrelerine bitişik olan sinüslerde akan kanla sinüzoidler şeklinde karaciğere girer. HCV, sinüs astarından ve karaciğer hücrelerinin yan yüzeyinden hareket etme yeteneğine sahiptir. HCV, RNA polimeraza bağımlı olan büyük RNA hatası nedeniyle hızla mutasyona uğrayan 8 genotip içermektedir. Ayrıca virüste meydana gelen mutasyonlar nedeniyle alt tip olarak kabul edilen birçok varyant üretir. Virüs, glikoproteinler, hücre yüzey molekülleri CD81, LDL reseptörleri, SR-BI, DC-SIGN, Claudin-1 ve Occludin aracılığıyla virüsler arasındaki karmaşık etkileşimlerin bir sonucu olarak konakçı hücrelere girmektedir (Kohaar *et al.* 2010).

Konakta HCV katmanda lipoproteinlere bağlanabilir ve virüsün kendisini E1 ve E2'yi içeren lipoproteinlerle kapsülleyebilir. Bu lipoproteinler, çöpçü reseptör sınıf BI'ya (SR-B1) bağlanır. Düşük yoğunluklu lipoproteinler VLDL ve LDL, HCV kaplamasına benzer. Dolayısıyla bu benzerlik sonucunda virüs lipoproteinlere bağlanabilmektedir. Bu virüs, kendisini bir dereceye kadar E1 ve E2'yi kapsayan lipoproteinlerle kaplamaktadır. Daha sonra, bu lipoproteinler SR-B1'e bağlanır. SR-B1, virüsü

çevreleyen lipoproteinlerden lipitleri çıkarabilen bir proteindir ve bu durum hiper değişken bölgenin (HVR) iletişim kurmasını sağlamaktadır. Claudin1 proteini, CD81 ile bir kompleks oluşturur ve HCV sonrası enfeksiyon süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Makrofajlar, bağışıklık sistemi devreye girerken, etkilenen hepatositlerin etrafındaki TNF miktarını artırır. Klatrin proteinleri, belirli reaksiyonlar yoluyla, hücresel bir ev olan viral partikülün oluşumunu kolaylaştırır. Endozom, viral zarf ve RNA'nın füzyonundan sonra sitoplazmaya ulaşmaktadır (Dubuisson *et al.* 2014).

HCV, replikasyon amacıyla hücre içi mekanizmaların parçalarını almaktadır. Yaklaşık 3011 amino asitlik tek bir protein üretmek için HCV genomu çevrilirken, HCV proteinleri ve hücresel proteazlar, 3 yapısal protein (viryona bağlı) ve 7 yapısal olmayan protein (NS) verecek şekilde çoklu proteinleri bozar. Birincil bölgedeki bir çerçeve değişikliği, bir ARFP'nin üretilmesine neden olabilir. Hem NS2 hem de NS3-4A, HCV tarafından kodlanmıştır. Viral genom, değiştirilmiş sitoplazmik membranlara bağlanan NS proteinleri tarafından RNA replikasyon kompleksine alınır. RNA replikasyonu sırasında, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz NS5B, negatif RNA'nın bir ara zincirini oluşturur. Negatif filamentli RNA daha sonra yeni pozitif filamentli viral genomlar oluşturmak için kullanılır. Bundan sonra, embriyonik genomlar kodlanabilir, kopyalanabilir veya yeni virüs partiküllerine paketlenebilir. HCV, hücrelerin içindeki lipid zarlarda çoğalır (Dubuisson *et al.* 2002). Membran ağları, endoplazmik retikulum benzersiz şekillere sahip zar yapılarına büküldüğünde oluşur. NS4B, viral proteinin tek bir ifadesi ile aktive edilir. HCV'nin p22'si lipid damlacıklarına bağlanır ve onları çekirdeğin dağılımında yeniden konumlandırmak için mikrotübülleri kullanır. VLDL sekresyon yolu, karaciğer hücrelerinin serbest bırakılmasında rol oynamaktadır (Egger *et al.* 2002).

2.4.3.7 Viral birleşme

HCV-RNA'yı çevreleyen önemli proteinlerden oluşan nükleer kapsülü oluşturan DGAT1 enzimi, HCV moleküllerinin hücresel LDL'nin yakınında toplanmasına yardımcı olur. Çekirdek proteinler HCV-RNA, birleştirme işlemi boyunca yapı iskelesi olarak kullanılır ve proteinler HCV-RNA çevresinde koruyucu bir zarf oluşturur. Pulpa

oluşturulduğunda, olgunlaşmamış HCV partikülü, yüksek yoğunluklu bir HCV öncüsü oluşturmak için ApoE proteinleri ile dolu parlak bir lipid damlacığı ile birleşmektedir (Crouchet *et al.* 2017).

2.4.3.8 Olgunlaşma

Golgi cisimciğinde de, ön-VLDLler, VLDL'ler oluşturmak için trigliserit (TG) açısından zengin lipid damlacıkları ile birleşir. VLDL'ler, yüksek yoğunluklu HCV öncüllerine bağlanarak bir HCV lipid partikülü oluşturur. Bu düşük yoğunluklu lipozom HCV, polimerik cisimler olarak bilinen özel taşıma veziküllerinde bir TGN'den ayrılır. Çok hücreli varlıklar, sitozolik sistem yoluyla hücre yüzeyine taşınır. Nakil için gerekli olan dahili tarama kompleksi (ESCRT), polimerik gö*et al.*enin oluşumunda ve hücre yüzeyine taşınmaya ve lipovirüs partikül salımına yol açan müteakip fazlarda da rol oynar (Syed *et al.* 2017).

2.4.3.9 Viral salınım

Hepatit C virüs partiküllerini içeren çoklu görünür cisimler hücre yüzeyine taşındıktan sonra veziküller hepatosellüler membran ile kaynaşır. HCV lipozom üretimi hücresel VLDL yoluna bağlıdır ve bu aktiviteler sırasında HCV lipid ve VLDL partikülleri hepatik hücre dışı bölümlere boşaltılmaktadır (Coller *et al.* 2012).

2.5 HCV İletimi

HCV, çoğunlukla aşağıda belirtilen yollarla yayılan, kan yoluyla bulaşan bir virüstür:

- İğne paylaşımı ile ilaç alınması yoluyla,
- Sağlık bakım ortamlarında bulunan tıbbi ekipmanın, özellikle şırınga ve iğnelerin yeniden kullanımı nedeniyle,
- İncelemeye tabi olmayan kan transfüzyonu veya türevlerinden birinin yapılması,
- Özellikle genelevlerde cinsel uygulamalar yoluyla,

- Ayrıca anneye bulaşmışsa çocuğuna da geçebilir fakat bu nadir görülen bir durumdur.

HCV, anne sütü, yiyecek, su veya enfekte bir kişiyle sarılma, öpüşme kasıtsız temas yoluyla bulaşmaz.

2.6 HCV Epidemiyolojisi ve Genotipi

2.6.1 Epidemiyolojisi

HCV kan yoluyla bulaşır ve küçük bir yüzdede olsa cinsel ilişki yoluyla da bulaşmaktadır. Damar içi uyuşturucu kullanıcıları, kan ürünü alıcıları ve hemodiyaliz hastaları (diyaliz) risk altındaki başlıca gruplar olarak sıralanmaktadır. Hastane içi (nozokomiyal) bulaşma, özellikle sağlık kliniklerinde katı hijyen ve sterilizasyon yasalarına uyulmadığında yaygın bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. HCV'nin yayılmasını (dövme, sünnet, kadın sünneti gibi) bazı uygulama ve ritüellere nedeniyle olmaktadır (Alter 2011). En önemli olgu, bu hastalığın semptomlarının ortaya çıkmasının uzun yıllar sürmesidir. Bu yüzden buna 'sessiz salgın' denmektedir (Pybus *et al.* 2007).

2.6.2 HCV genotipleme

Genotipleme (GT), HCV'yi benzer genlere dayalı kategorilere ayırma anlamına gelmektedir. GT1a ve GT1b gibi harflerle tanımlanan çeşitli alt türleri vardır. Kişilerin çoğuna tek bir baskın genotip bulaşmıştır; ancak aynı anda (karma enfeksiyon olarak adlandırılan) birçok genotipe sahip olmak da mümkündür. Altı adet HCV GT vardır ve genom yapısının en az %30'u olacak şekilde genotipler arasındaki moleküler farklılıklar bulunmaktadır. Bunlar arasında GT1, dünyadaki en yaygın tiptir ve diğer tüm GT'lerin %40 ile 80'ini oluşturmaktadır (Smith et al. 2011). Çizelge 2.2 HCV alt tipleri ile doğrulanmış genotipleri göstermektedir (Smith et al. 2014).

Çizelge 2.2 HCV alt tipleri ile doğrulanmış genotipler (Smith *et al.* 2014)

HCV Genotipi	HCV Alt Tipi	Referanslar
GT1	1a	Ohno *et al.* (1997)
	1b	Ohno *et al.* (1997)
	1c	Lu *et al.* (2014)
	1d	Lu *et al.* (2014)
	1e	(Lu *et al.* (2014); Li *et al.* (2013)
	1g	Lu *et al.* (2014)
	1h	(Lu *et al.* (2014); Li *et al.* (2013)
	1i	Lu *et al.* (2014)
	1j	Lu *et al.* (2014)
	1k	Lu *et al.* (2014)
	1l	Li *et al.* (2013)
	1m	Lu *et al.* (2014)
	1n	Lu *et al.* (2014)
	1o	Wang *et al.* (2019)
GT2	2a	Ohno *et al.* (1997)
	2b	Ohno *et al.* (1997)
	2c	Nakao *et al.* (1996)
	2d	Li *et al.* (2012)
	2e	Li *et al.* (2012)
	2f	Xu *et al.* (2013)
	2g	Li *et al.* (2012)
	2h	Li *et al.* (2012)
	2i	Noppornpanth *et al.* (2006)
	2j	Li *et al.* (2012)
	2k	Samokhvalov *et al.* (2000)
	2l	Jordier *et al.* (2013)
	2m	Li *et al.* (2012)
	2n	Li *et al.* (2012)
	2o	Li *et al.* (2012)
	2p	Li *et al.* (2012)
	2q	Martro *et al.* (2011)
	2r	Li *et al.* (2012)
	2t	Jordier *et al.* (2013)
	2u	Li *et al.* (2012)
	2v	Rajhi *et al.* (2021)
	2w	Rajhi *et al.* (2021)
GT3	3a	Ohno *et al.* (1997)
	3b	Ohno *et al.* (1997)
	3d	Li *et al.* (2014)
	3e	Li *et al.* (2014)
	3g	Lu *et al.* (2013)
	3h	Lu *et al.* (2013)
	3i	Lu *et al.* (2013)
	3k	Lu *et al.* (2013)
GT4	4a	Legrand *et al.* (2009); Al-Qahtani *et al.* (2017)
	4b	Koletzki *et al.* (2009)
	4c	Fernández *et al.* (2006)
	4d	Fernández *et al.* (2006)
	4f	Pasquier *et al.* (2005)
	4g	Li *et al.* (2009)
	4k	Pasquier *et al.* (2005)
	4l	Li *et al.* (2009)

Çizelge 2.2 (Devamı)

HCV Genotipi	HCV Alt Tipi	Referanslar
GT4	4m	Li *et al.* (2009)
	4n	Li *et al.* (2009)
	4o	Li *et al.* (2009)
	4p	Pasquier *et al.* (2005); Li *et al.* (2009)
	4q	Li *et al.* (2009)
	4r	Li *et al.* (2009); Shah *et al.* (2021)
	4s	Lu *et al.* (2015)
	4t	Pasquier *et al.* (2005)
	4v	Demetriou *et al.* (2011)
	4w	Lu *et al.* (2015)
GT5	5a	Ohno *et al.* (1997)
GT6	6a	Ohno *et al.* (1997)
	6b	Chen *et al.* (2017)
	6c	Lu *et al.* (2007)
	6d	Tong *et al.* (2015)
	6e	Li *et al.* (2015); Li *et al.* (2006)
	6f	Kumthip *et al.* (2011); Lu *et al.* (2007)
	6g	Li *et al.*, (2006)
	6h	Li *et al.* (2015)
	6i	Lu *et al.* (2007)
	6j	Chen *et al.* (2017); Lu *et al.* (2007)
	6k	Lu *et al.* (2006)
	6l	Lu *et al.* (2007)
	6m	Lu *et al.* (2007)
	6n	Lu *et al.* (2006)
	6o	Lu *et al.* (2007)
	6p	Noppornpanth *et al.* (2006)
	6q	Chen *et al.* (2017)
	6r	Li *et al.* (2009)
	6s	Li *et al.* (2009)
	6t	Noppornpanth *et al.* (2008)
	6u	Noppornpanth *et al.* (2008)
	6v	Wang *et al.* (2009)
	6w	Lee *et al.* (2010)
	6xa	Ye *et al.* (2019)
	6xb	Li *et al.* (2014)
	6xc	Li *et al.* (2014)
	6xd	Li *et al.* (2015)
	6xe	Li *et al.* (2015)
	6xf	Ye *et al.* (2019)
	6xg	Ye *et al.* (2019)
	6xh	Wu *et al.* (2018)
	6xi	Yue *et al.* (2020)
GT7	7a	Nakano *et al.* (2015)
	7b	Salmona *et al.* (2016)
GT8	8a	Borgia *et al.* (2018)

Genotip-1a ve Genotip-1b Amerika'da yaygınken, GT1a Amerika dışında daha az yaygındır. Genetik modeller GT2 ve GT3 dünyanın çoğu yerinde yaygındır. GT1 tipinin ve özellikle GT1b'nin, diğer genotiplere kıyasla tedaviye yanıt vermediğine dikkat edilmelidir. Ayrıca, GT1 sıklıkla ciddi karaciğer hastalığı ve hepatosellüler karsinomun ilerlemesi ile bağlantılıdır. Diğer genotiplere gelince, coğrafi yayılımları vardır. Örneğin, GT3 Avustralya, Hindistan ve Tayland'da, GT4 Mısır ve Orta Doğu'da, GT5 Güney Afrika'da ve GT6 Güneydoğu Asya'da, özellikle Hong Kong ve Makao ve Vietnam'da yayılmaktadır. Ayrıca, İskoçya'da uyuşturucu enjekte edilmesi ile GT3'lerin yayılımının olduğu bazı kanıtlar bulunmaktadır (Ghany *et al.* 2009).

GT7 ve GT8'in son yıllarda ortaya çıkan yeni genotipleri vardır. Ayrıca, Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nden hastalarda yeni bir HCV GT keşfedilmiştir. Prototip QC69 virüsünün, GT1'den GT6'ya farklılık gösteren yeni bir nesile ait olduğu keşfedilmiştir. Üç hastanın daha bu soydan bir virüsle enfekte olduğu bulunmuş olması bu virüsün insanlarda hala dolaştığını göstermektedir. Sonuç olarak, bu virüsler HCV GT7 olarak sınıflandırılmalıdır (Smith *et al.* 2014). GT8'in keşfi Sergio M. Borgia ve diğerleri tarafından yapılan çalışma ile rapor edilmiştir (Borgia *et al.* 2018).

2.7 HCV Doğal Geçmişi

Hepatit C, HCV içeren kan ve vücut sıvıları ile temas yoluyla yayılan HCV'nin neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Bu hastalık karaciğere zarar verir. İki tip hepatit C enfeksiyonu vardır. Bunlar; akut ve kronik olarak sınıflandırlmaktadır.

2.7.1 HCV'ye maruz kalmış ama enfekte olmamış kişiler

HCV maruz kaldıktan sonra insanlar için klinik olarak ve HCV RNA- veya HCV antikorları tarafından taranabilen nadir olumsuz sonuçlar vardır. Bu özelliği sergileyen kişilere virüse maruz kalan fakat enfekte olmamış kişiler denir. Enfeksiyonu olan ancak viral hepatitten geçici olarak kurtulanlardan kişilerden ayırt edilen bu kategorideki insanlar hakkında birçok çalışma bulunmaktadır. Maruz kalan enfekte olmamış

çalışması, antiviral terapötik stratejileri ortaya çıkarabilecek antiviral direnç mekanizmalarının keşfi ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle, spontan analizörler için maruz kalan enfekte olmamış ile, HCV ile kronik enfeksiyon geliştirenlerin çoğunluğu arasında benzerlikler ve farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca virüse karşı direnç mekanizmalarının doğuştan gelen, adaptif, genetik ve lipid reaksiyonları arasında da farklılıklar bulunmaktadır (Shawa *et al.* 2017).

2.7.2 Akut HCV enfeksiyonu

Semptomlar genellikle hafif ve belirsizdir ve şunları içerebilir:

- Vücut ısısında yükselme (Ateş)
- Mide bulantısı
- Kusma
- Yorgunluk
- Eklem veya Kas ağrıları
- Karın ağrıları
- İştahsızlık ve kilo kaybı
- İdrarda sarılık renk (Shiffman 2011).

HCV enfeksiyonu karaciğer enzimlerinde artışa neden olmaktadır. HCV enfeksiyonunu doğrulayan ileri tetkiklerinin yapılması, hepatit C'nin erken dönemde doğru teşhisini sağlamaktadır. Enfekte kişilerin %10-50'sinde enfeksiyon akut fazda iken daha sonra bu durum ortadan kalkabilir (Shiffman 2011).

2.7.3 Kronik HCV enfeksiyonu

Virüse maruz kalanların %80'inde kronik enfeksiyon meydana gelmektedir (Nelson *et al.* 2011). Yaklaşık 6 aylık bir süre boyunca viral replikasyonun varlığı tespit edilebilir. Ayrıca, enfeksiyonun ilk birkaç on yılı içinde kişilerin çoğunluğunda çok az semptom görülür veya hiç görülmeyebilir. Kronik HCV, bilişsel bozukluk ve yorgunluk ile

ilişkilidir. Uzun bir süre boyunca kronik enfeksiyona maruz kalmak, karaciğer kanserine veya siroza yol açabilir. Bu vakaların %7-53'ünde karaciğer enzimleri normal seyrinde bulunmaktadır (Shiffman 2011).

2.7.4 HCV enfeksiyonunun komplikasyonları

2.7.5.1 Karaciğer hastalığı

Hepatit, genellikle gelişmesi uzun zaman alabilen çok aşamalı bir süreçtir. Kronik inflamasyon karaciğere zarar verebilir ve karaciğerde fibroz adı verilen yara dokusunun birikmesine neden olabilir. Yara dokusunun büyümesi sonucunda sağlıklı karaciğer dokusunun yerini almasına neden olur ve bu da karaciğerin çalışma yeteneğinde artan bir azalmaya neden olur. Bir süre sonra bu yara izi karaciğerin büyümesine ve ciddi şekilde siroz olarak adlandırılmasına neden olabilir. Sirozlu olan kişilerde karaciğer çok veya hiç çalışmamaktadır (Davis *et al.* 2003).

2.7.5.2 Karaciğer yetmezliği

Karaciğer yetmezliği, karaciğerin işlev görme yeteneğinin kaybı olarak ifade edilmektedir. Acil ve aşırı tıbbi müdahale gerektiren ciddi, yaşamı tehdit eden bir durumdur. Karaciğer yetmezliği vakası, doktorların son evre karaciğer hastalığına (ESLD) ulaştığını belirttikleri sirozdan kaynaklanmaktadır. Bazı durumlarda, etkilenen kişinin ESLD geliştirmesi aylar hatta yıllar alabilmektedir (Miró *et al.* 2006).

2.7.5.3 Karaciğer kanseri

Kronik hepatit C enfeksiyonu karaciğer kanserine yol açabilir. HCV tedavisinde olduğu gibi, ciddi karaciğer hasarı olan bir kişinin karaciğer kanseri geliştirme riski yüksek olabilir. Çoğu zaman, karaciğer kanseri olan kişiler bu durumun hepatit C'ye bağlı olduğunu fark edebilirler. Enfekte kişilerde de karaciğer fonksiyon testlerinde değişiklikler gözlemlenebilir. Bu nedenle sirozlu kişilerin 6 ayda bir karaciğer kanseri

taraması yaptırmaları önerilir. Özellikle HCV olan kişilerde kan testleri ve ultrason taramalarının da yapılması önerilmektedir. Bu testler sayesinde hastanın iyileşmesi ve karaciğer kanserinin önlemesi mümkündür (Davis *et al.* 2003). HCC vakalarının yaklaşık %80'nini kronik viral hepatit oluşturmaktadır (El-Serag 2012).

2.8 HCV Laboratuvar Teşhisi

2.8.1 Hızlı HCV immünoassay antikor testi

Bu yöntem yüksek riski kişilerde veya viral hepatit belirti ve bulguları olan kişilerde kullanılabilir (Lee *et al.* 2010). Test; serum, plazma veya tam kan üzerinde kullanılabilen şeritler şeklinde yapılmaktadır. Bu test, viral genomun NS3, NS4, çekirdek protein bölgelerinden antijenleri kullanması nedeniyle %79-99 yüksek hassasiyet ile karakterize edilir (Smith *et al.* 2011).

2.8.2 Serolojik testler

2.8.2.1 Enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) ile anti-HCV tespiti

Hepatit C virüsünü teşhis etmek için kullanılan önemli testlerden biridir. Bağışçıların kanlarını, onlardan kan aktarımı olmadan önce incelemek amacıyla yapılmaktadır. Burada virüsün erken teşhisinden sonra antikorlar belirlenerek geliştirilir, ilerletilir ve virüsün yayılmasını önlemek amacıyla genellikle Alisa mekanizması kullanılmaktadır (Morishima and Gretch 1999). ELISA-I tekniğinin ilk nesli, HCV'nin saptanmasından sonra ortaya çıkmıştır. Bu teknik, NS4'ün protein sarmallı bölgesinden viral genoma antijen kullanımına dayanmaktadır. Bu nesil, belirli bir hassasiyet ile karakterizedir. İkinci nesil, NS4 protein bölgesinden antijenlerin kullanımını amaçlamaktadır. Viral genomun çekirdek proteini kullanan bu nesil, ilk nesilden daha özel ve hassastır. Üçüncü nesil, nano partikül proteinleri NS3, NS4 ve NS5 bölgelerinden alınan antijenlerin yanı sıra viral genomun pulpa protein bölgesinden alınan antijenlerini içermektedir. Bu nesil hem uzmanlık hem de duyarlılık açısından daha etkilidir. Burada N antikoru 5 haftalık

bir süre boyunca incelenmektedir (Uliana *et al.* 2014). Hepatit C virüsü ile akut enfeksiyonun kanıtı olarak hepatit C'li hastalarda IgM Anti-HCV varlığının kullanılması mümkün değildir, çünkü şiddetli enfeksiyonu olan hastalarda (%50-%90) IgM antikorları tespit edilmiştir ve kronik enfeksiyonu olan hasta kişilerde oran %50 - %70 olarak tespit edilmiştir (Mahmoud *et al.* 2018).

2.8.2.2 Üçüncü nesil rekombinant immünoblot (RIBA-3) testi

RIBA olarak bilinen bu test enzimatik immünolojik testin sonuçlarını doğrulamak için kullanılmaktadır. Bu test, ElAs yönteminde kullanılanla aynı antijeni kullanır. Bu antijen bir zar üzerinde ayrılır ve zar üzerindeki ışın sayısı sonucu göstermektedir. Ancak pozitif testler, yalnızca moleküler yöntemle tespit edilebilen aktif bir viral enfeksiyonu doğrulamamaktadır (Kamili *et al.* 2012).

2.8.3 Hepatit C virüsü için moleküler tanı teknikleri

HCV için RNA konsantrasyonunu belirlemek amacıyla moleküler teknikler kullanılır. Virüsün yetiştirilmesindeki zorluk nedeniyle, bu yöntemler virüse karşı tedaviye yanıtı teşhis etmek ve doğrulamak için önemlidir. Viral nükleik asit testi, aktif viral enfeksiyonun teşhisi için ideal kriter olmaya devam etmektedir. Virüs nükleik asidi, virüse maruz kaldıktan sonra bir haftadan daha kısa bir süre içinde saptanabilirse bu durum akut enfeksiyonu doğrulamak için önem arz etmektedir (Kamal 2008). Ayrıca, Anti-HCV'yi tespit etmek, serolojik yöntemlere kıyasla sonuçların karşılaştırlması imkanını sağlamaktadır. Yöntem, DNA'nın oluşumuna yardımcı olan TAQ polimeraz gibi amplifikasyon işlemine yardımcı olan bir dizi materyalin kullanılması ve ayrıca nükleotidleri deoksinükleotitler trifosfat (dNTP'ler) kullanılmasını kapsmaktadır. Primer de DNA'nın bir kopyası olan istenilen parçanın yerini tespit etmek için kullanılmaktadır. Bunun nedeni, RT.PCR termal döngüleyicinin reaksiyonun devam etmesi için oluşan ürün miktarını belirleyebilmesidir. Örneğin, boyadaki artışın belirlenmesi, bir florometre kullanılarak sentezlenen DNA ile bağlantılıdır. Test çok çeşitli numune konsantrasyonlarını kapsayabilme yeteneğinin yanı sıra birçok numunenin işlem görmesi nedeniyle hem kolay hem de hassastır. Bu işlmelerin sonunda

da jel analizi gibi analizlere gerek kalmamaktadır (Obaid 2014). RT.PCR cihazlarının gelişimi 1997'nin başlarında başlamıştır. Bu PCR'de, DNA şablonu görevi gören bir DNA test tüpündeki numuneler için entegre Florometre çalışmaktadır. Ek olarak, her döngüdeki yüksek floresan sinyali, amplifikasyonu gösterir ve RT.PCR'nin genetik analizde güçlü bir araç olduğu kanıtlar (Lee *et al.* 2008). PCR testinin ELISA testiyle karşılaştırılması ile ilgili sonuçlar Çizelge 2.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 2.3 Hastalık türüne göre moleküler test (PCR) sonuçlarını açıklanması (Mahmoud *et al.* 2018)

Anti HCV- Ab	HCV RNA (PCR)	Açıklama
Olumsuz Sonuçlar	Olumsuz Sonuçlar	Enfeksiyon yok
Olumlu Sonuçlar	Olumlu Sonuçlar	Aktif enfeksiyon (akut veya kronik)
Olumsuz Sonuçlar	Olumlu Sonuçlar	Zayıf bağışıklığı olan hastalarda erken enfeksiyon veya kronik enfeksiyon.
Olumlu Sonuçlar	Olumsuz Sonuçlar	Giderildi Enfeksiyon tedavi edildi Anti-HCV testi için yanlış pozitif sonuç HCV konsantrasyonu saptanabilir seviyenin altında

2.8.3.1 Kalitatif hepatit C virüsü RNA tespiti

HCV RNA'yı saptamaya yönelik kalitatif yöntemler, kandaki virüsleri teşhis etmenin yanı sıra, Sürekli Virolojik Yanıt (SVR) olarak bilinen bir viral yanıtı veya virüsün nihai eliminasyonunu doğrulamaya karşı son derece hassastır. Bu durum, antiviral ilaçlarla tedavi tamamlandıktan sonra altı ay veya daha uzun bir süre boyunca kanda HCV enfeksiyonunun tamamen yokluğu olarak da adlandırılmaktadır (Chihiro *et al.* 2006). Bu yöntemler, "TMA" olarak kısaltılan Klasik PCR, RT.PCR, Transkripsiyon Aracılı Amplifikasyon testleri de olmak üzere hedefi büyütmek için kullanılan standarda bağlıdır (Pawlotsky 2002). RT.PCR yöntemi, Kompleman DNA'yı (cDNA) Ters Transkriptaz ile sentezlemek için bir şablon olarak RNA'yı kullanır ve daha sonra DNA polimeraz tarafından desteklenen DNA'yı dsDNA'dan kopyalanacak şekilde çoğaltır. Daha sonra viral genomun transkripsiyonu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile büyütülürken, transkripsiyon (ssRNA) orta kopya büyütme (TMA) ile oluşturulur. HCV

RNA'yı saptamaya yönelik spesifik yöntemlerin duyarlılığı tüm HCV genotipleri için yaklaşık 50 IU/mL veya daha az olarak bilinmektedir (Mahmoud *et al.* 2018).

2.8.3.2 Kantitatif hepatit C virüsü RNA tespiti

HCV RNA'nın kantitatif tespiti, gerçek zamanlı RNA'ların (RT.qPCR) kantitatif amplifikasyonu ve ayrıca dallı DNA'nın (bDNA) amplifikasyonu olmak üzere çeşitli yollarla gerçekleştirilmektedir. RT.qPCR teknolojisi, vücutta düşük miktarlarda olsa bile DNA'yı tespit etme yeteneği ile karakterize edilir. Bu yöntem aynı zamanda yaklaşık %99'a varan yüksek duyarlılığı ile de karakterize edilmektedir (Sarrazin *et al.* 2006).

2.9 Hepatit C Virüsünün Bağışıklığı

2.9.1 Bağışıklığın tanımı

Bağışıklık, çok hücreli organizmaların zararlı mikroorganizmalara direnme yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Bağışıklık hem spesifik hem de spesifik olmayan bileşenleri içerir. Spesifik olmayan bileşenler, antijenik yapılarından bağımsız olarak çok çeşitli patojenlerin bariyerleri veya eliminatörleri olarak işlev görür. Bağışıklık sisteminin diğer bileşenleri, karşılaşılan her yeni hastalığa kendilerini adapte eder ve patojene özgü bağışıklık oluşturabilir (Mahmoud *et al.* 2018).

2.9.2 Bağışıklık türleri

2.9.2.1 Doğuştan gelen bağışıklık

Otoimmün veya mantar immün yanıtı olarak kabul edildiğinden, otoimmün HCV enfeksiyonundan kurtulmada önemli bir rol oynar. Doğuştan gelen bağışıklık, enfeksiyonun kuluçka evresinde erken harekete geçen ilk savunma hattıdır ve daha sonra etkinliği, adaptif bağışıklık ile temsil edilen ikinci savunma hattını başlatmak için

düşer. Doğal öldürücü hücreler, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler olan bir bağışıklık hücreleri sistemi üzerindeki ana otoimmün öğeleri içerir ve bu hücreler hepatositlerin interferon tip 1'i ve ayrıca interferon uyarıcı genleri (ISG'ler) üretmek için birlikte çalışır. Toll-benzeri reseptörler 3 (TLR3) gibi reseptörler, retinoik asit üretimini uyaran genlerin yanı sıra doğuştan gelen bağışıklığa da katkıda bulunur ve retinoik asit ile indüklenebilir genler-I (RIG-I) olarak bilinir ve bu genlerin spesifik moleküler paternleri için reseptörler bulunmaktadır (Tarr *et al.* 2012).

Viral proteinler, doğal öldürücü hücrelerin (NK) etkinliğine nüfuz etmede önemli bir rol oynar; HCV virüsü kaplamasından kaynaklanan proteinler, doğal öldürücü hücrenin yüzeyine bağlanır ve böylece toksisitelerini ve sitotoksik devrelerin salgılanmasını durdurur. HCV'li hastalardan izole edilen doğal öldürücü hücrelerin, dendritik hücreleri aktive etme kabiliyetinin zayıf olduğu gözlemlenmiştir. Dendritik hücreler giriş hücrelerindendir. Antijen sunan hücreler, Hepatit C virüsü de dahil olmak üzere virüslere karşı bağışıklıkta önemli bir rol oynar zira bu hücreler adaptif bağışıklık yanıtındaki rollerini yerine getirmek için CD4 yardımcı lenfositlere ve CD8 toksik lenfositlere antijen sağlamaktadır (Mahmoud *et al.* 2018).

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin ana işlevleri şunlardır:

1. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, bağışıklık hücrelerini toplar ve çalıştırır ve sitokinler gibi belirli kimyasal ajanlar üreterek onları enfeksiyon bölgelerine gönderir.
2. Bakterileri tanımlamanın yanı sıra hücreleri aktive etmek ve ölü hücrelerin veya antikor komplekslerinin çıkarılmasını teşvik etmek amacıyla tamamlayıcı diziyi aktive eder.
3. Doku, organ, lenf ve kandaki yabancı maddelerin özelleşmiş beyaz kan hücreleri tarafından tanımlanmasında ve uzaklaştırılmasında önemli bir role sahiptir.
4. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, antijen sunumu olarak bilinen bir süreç aracılığıyla adaptif bağışıklık sistemini harekete geçirir.
5. Zararlı bulaşıcı ajanlara karşı fiziksel ve kimyasal bir bariyer olması açısından çok önemlidir. Deri gibi fiziksel ölçülerle veya kandaki pıhtılaşma faktörleri gibi kimyasal ölçülerle temsil edilirler (Mahmoud *et al.* 2018).

2.9.2.2 Adaptif bağışıklık

Adaptif bağışıklığın iki önemli kolu bulunmaktadır. Bunlar, T-lenfositleri ve Hümoral bağışıklık yanıtını olarak sıralanmaktadır. T-lenfositlerini içeren aracılı bir bağışıklık yanıtı olan hücre, aracılı bir bağışıklık yanıtı olduğundan gelişmesi birkaç hafta sürmektedir (Bowen and Walker 2005).

Hücre Aracılı Bağışıklık

Hücreye bağlı bağışıklık tepkisinin ana bileşeni, enfeksiyondan 5-10 hafta sonra ortaya çıkan CD4 yardımcı T hücresi ve CD8 sitotoksik T hücresidir. Hem şempanzelerde hem de insanlarda, genellikle virüsün ortaya çıkmasıyla ilişkili olan HCV'nin T hücrelerine karşı güçlü ve geniş bir yanıt olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bu durm sayesinde çeşitli antijenik belirleyicileri ve çoğu hepatit C virüsünü hedef alan T hücrelerine de yanıt bulunmuştur. Uzun süreli CD4 T-lenfosit hücrelerinin tepkisinin akut enfeksiyon ile ilişkili olduğu ve kandaki enfeksiyonun (viremi) T-yardımcı lenfositlerin kaybı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. CD8 toksik lenfositlerin yanıtına gelince, sitotoksik T hücrelerinin yokluğu kronik enfeksiyona yol açtığından, kandaki virüsleri kontrol etme yeteneği olmadan CD4 T-yardımcı lenfositlerin yanıtının yokluğunda gelişmektedir (Mahmoud *et al.* 2018). Toksik T hücreleri ayrıca, interferon veya doğrudan hücresel toksisite gibi hücresel moleküllerin salınımını içeren toksik olmayan bir mekanizma ile viral enfeksiyonu ortadan kaldırmaktadır. T hücrelerine verilen yanıt, kanda az sayıda antijenik determinantı hedefleyen T hücrelerinin virüse özgü olduğu kronik faz sırasında sıklıkla kaybolmaktadır. Çalışmalar, HCV ile ciddi enfeksiyon geçirmiş kişilerde CD4 T-yardımcı hücre hafızasının ve CD8 sitotoksik T-hücre hafıza hücrelerinin bulunduğunu doğrulamıştır. Bağışıklık hafıza hücreleri, virüse tekrar maruz kalmaktan korunmaya katkıda bulunmasa da, virüsün kendisine yeniden maruz kaldıktan sonra kronik enfeksiyonla ilişkili risk faktörlerini azaltmaktadır (Mahmoud *et al.* 2018).

Humoral Bağışıklık

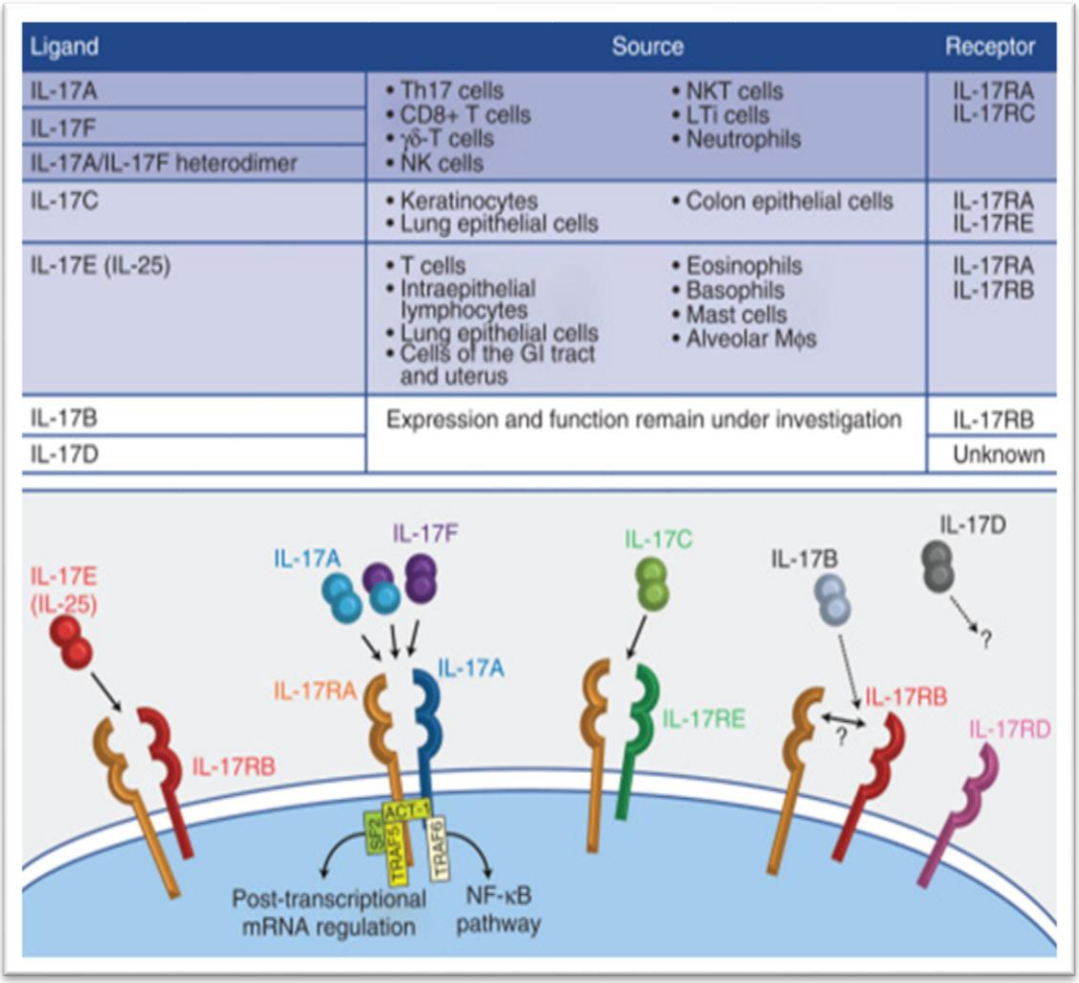
HCV'ye karşı özel antikorlar genellikle ilk enfeksiyondan 3-4 hafta sonra belirlenir. Bu antikorların büyük bir kısmı enfeksiyon sırasında B lenfositleri tarafından üretilir ve virüsün ortaya çıkmasında antikorların savunma rolünü destekleyen veriler şimdiye kadar çok açıklayıcı değildir (Pawlotsky 2004). Bazı durumlarda yapılan çalışmalar HCV'nin doğal olarak üretilen bazı antikorlarının enfeksiyonu ortadan kaldırılmadığını ortaya koymuştur. Ayrıca, antikorlar için yüksek oran genellikle kronik hastalarda gözlenmektedir. Laboratuvar ortamında, HCV'ye karşı antikorların, hem insanlarda hem de şempanzelerde yapılan in vivo çalışmalar dışında hedef hücre enfeksiyonunun önlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Kan nakli işlemi, virüse maruz kalmadan önce uygulandığı için hepatit NANB virüsüne karşı koruma sağladığı ve antikorlarla ilişkili viral partiküllerin enfeksiyona serbest viral partiküllere göre daha az duyarlı olduğu da gösterilmiştir (Mahmoud *et al.* 2018). Ayrıca, eşdeğer güçlü bir antikorun ortaya çıkmasının, kandaki virüslerde önemli bir azalma ile ilişkili olduğu ve eşdeğer yanıtın kaybının daha yüksek düzeyde virüs replikasyonuna yol açtığı bulunmuştur (Lavillette *et al.* 2005). Çalışmalar, antikorların HCV virüs antijenlerinin tümüne özgü olduğunu göstermiştir. Ancak bu antikorların doğal amacı, HCV virüsünün genetik materyalinin en değişken bölgelerinden olan E1 ve E2 olmak üzere iki tip epitelyal glikoproteine sahip olduğu kanıtlamaktır (Meunier *et al.* 2008).

2.9.3 İnterlökin-17 (IL-17)

IL-17 sitokin ailesine (IL17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ve IL-17F) aittir. T hücreleri bu sitokini (T yardımcı hücre 17 olarak bilinir) meydana getirmektedir. IL-17 ailesinin tüm üyelerinin protein yapıları aynıdır ve protein dizileri, güçlü bir şekilde korunmuş dört sistein kalıntısı içermektedir. Tüm protein molekülünün uygun 3D formu, bu korunmuş sistein kalıntılarına bağlıdır. IL-17 ailesi üyeleri diğer sitokinlerle hiçbir ana homoloji dizisine sahip değildir (Rouvier *et al.* 1993). IL-17F ekspresyonu çeşitli enfeksiyon türlerinde tespit edilmiştir ve esas olarak mukozal konak savunma mekanizmalarında bulunmaktadır (Ishigame *et al.* 2009).

2.9.3.1 IL-17F tanımlayıcıları

CD4+ T hücrelerinin ve monositlerin aktivasyonundan sonra IL-17F salgılanır. IL-17F, granülosit-makrofaj, koloni uyarıcı faktör 2 (CSF2) olarak da bilinen, koloni uyarıcı faktöre (GM-CSF) ek olarak IL-6 ve IL-8 ile temsil edilen sitokinleri üretmek için IL-17 reseptörüne IL17RC'ye bağlı molekül bağlanmaktadır. Bu durum da; IL-17F, matris devir hızlarının kontrol edilmesinde, endotel hücrelerinde anjiyogenezin sınırlandırılmasında ve endotel hücrelerinde IL-2, MCP-1 ve TGF-β1 ekspresyonunun arttırılmasında rol oynamaktadır (Kerr *et al.* 2004). IL-17 ailesinin reseptörleri ve köken aldığı hücreler ile ilişkisi Şekil 2.3'te gösterilmektedir.

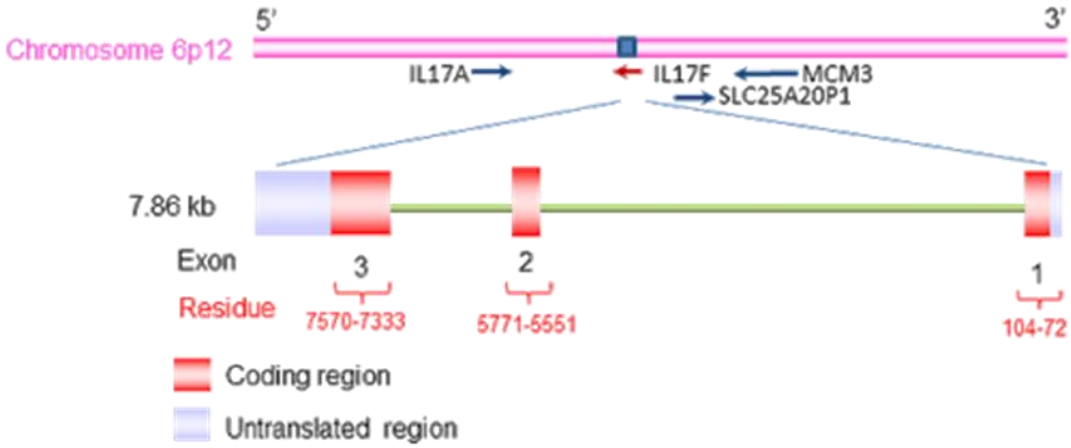


Ligand	Source		Receptor
IL-17A IL-17F IL-17A/IL-17F heterodimer	• Th17 cells • CD8+ T cells • γδ-T cells • NK cells	• NKT cells • LTi cells • Neutrophils	IL-17RA IL-17RC
IL-17C	• Keratinocytes • Lung epithelial cells	• Colon epithelial cells	IL-17RA IL-17RE
IL-17E (IL-25)	• T cells • Intraepithelial lymphocytes • Lung epithelial cells • Cells of the GI tract and uterus	• Eosinophils • Basophils • Mast cells • Alveolar Mφs	IL-17RA IL-17RB
IL-17B	Expression and function remain under investigation		IL-17RB
IL-17D			Unknown

Şekil 2.3 IL-17F ailesi ligandları ve reseptörleri (Martin *et al.* 2013)

2.9.3.2 IL-17F geni

IL17F geni, üç ekzondan (translasyon edilmemiş bölge (UTR)oluşmaktadır. Bunlar, Açık mavi (kodlama bölgesi, kırmızı) ve iki yeşil introndan oluşan 7,86 kb'lik bir bölgeyi kapsamaktadır. Ekzon 1, 2 ve 3 sırasıyla 141bp (108bp 5' UTR artı 33bp kodlama bölgesi), 221bp (tüm kodlama bölgesi) ve 488bp (238bp kodlama bölgesi artı 250bp 3' UTR) uzunluğundadır. İki intron sırasıyla 5446bp ve 1561bp uzunluğundadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 IL-17F geni (Huret *et al.* 2012)

2.9.4 Toll-benzeri reseptör (TLR)

TLR'ler, doğuştan gelen bağışıklıkta önemli bir rol oynayan tek yollu membran reseptörlerini temsil eden bir protein sınıfıdır. Mikroplardan türetilen yapısal olarak korunmuş molekülleri tanıyabilen sentinel hücrelerde (makrofajlar ve dendritik hücreler) ifade edilir. Mikroplar deriye ve mukoza zarlarına ulaştığında TLR'ler tarafından tanınır. Daha sonra bağışıklık hücreleri aktive edilir. TLR'ler; TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 ve TLR13 olarak sınıflandırılır. Ancak bunlardan son üçü insanlarda bulunmaz (Mahla *et al.* 2013). TLR ailesinin mikroorganizmalarla ilişkisini Çizelge 2.4 gösterilmektedir.

Çizelge 2.4 TLR'ler tarafından PAMP tespiti (Ueta *et al.* 2007)

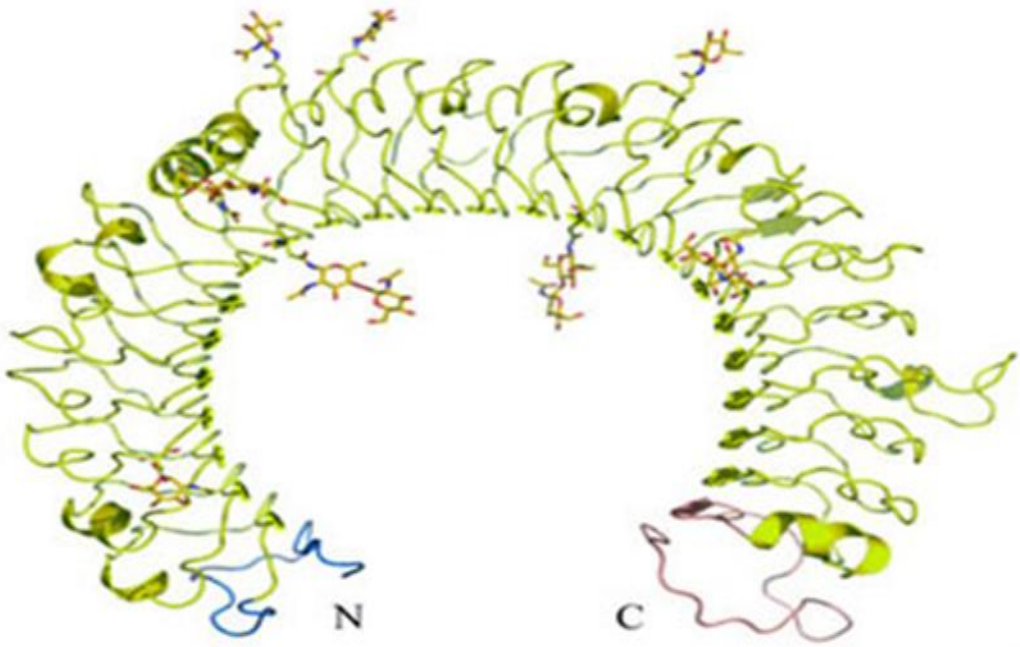
TLRs	Lokalizasyonu	Mikroorganizma
TLR1	Hücre zarı	Bakteri
TLR2	Hücre zarı	Bakteri, Mantarlar ve Parazitler
TLR3	Endolizozom	Virüsler
TLR4	Hücre zarı	Bakteri, Virüsler, Parazitler ve Mantarlar
TLR5	Hücre zarı	Bakteri
TLR6	Hücre zarı	Bakteri, Virüsler ve Mantarlar
TLR7	Endolizozom	Bakteri, Virüsler, Mantarlar ve özü
TLR8	Endolizozom	Virüsler
TLR9	Endolizozom	Bakteri, Virusler, Mantarlar ve Parazitler
TLR10	Endolizozom	Bilinmiyor
TLR11	Hücre zarı	Protozoa

2.9.4.1 Toll benzeri reseptör 3 (TLR3)

TLR3, işlevi yabancı antijenleri tanımak olan ve bunlar aracılığıyla bağışıklık sistemini harekete geçirdikleri toll benzeri reseptörler ailesinin bir üyesidir (Rock *et al.* 1998).

2.9.4.2 TLR3 yapısı

TLR3 yapısı Haziran 2005'te tanımlanmıştır (Choe *et al.* 2005). TLR3, yüzeyinin büyük bir kısmı şeker molekülleriyle kaplı olduğu için bir glikoprotein olarak sınıflandırılır. Ek olarak, at nalı şeklindeki formu, yanındaki başka bir at nalı ile temas ederek iki at nalı "dimmer"i oluşturur. Ayrıca TLR3'ün şekersiz geniş bir yüzeye sahip olduğu ve bu yüzeyin, negatif yüklü çift sarmallı RNA için bir alan oluşturduğu pozitif yüklü amino asitler açısından zengin iki ayrı nokta içerdiği belirtilmelidir. Yaydan 270 dereceye ulaşan sert bir şekilde bükülmüş ve sürekli bir ß plakası, 25 paralel ß teli, 23 LRR ve bir tane N ve C terminal başlık alanından oluşur (Şekil 2.6). Dış yüzeyde çok sayıda ikincil yapısal özellik görülebilmektedir (Alexopoulou *et al.* 2001).



Şekil 2.5 İnsan TRL3 ECD'sinin genel yapısı (Choe *et al.* 2005)

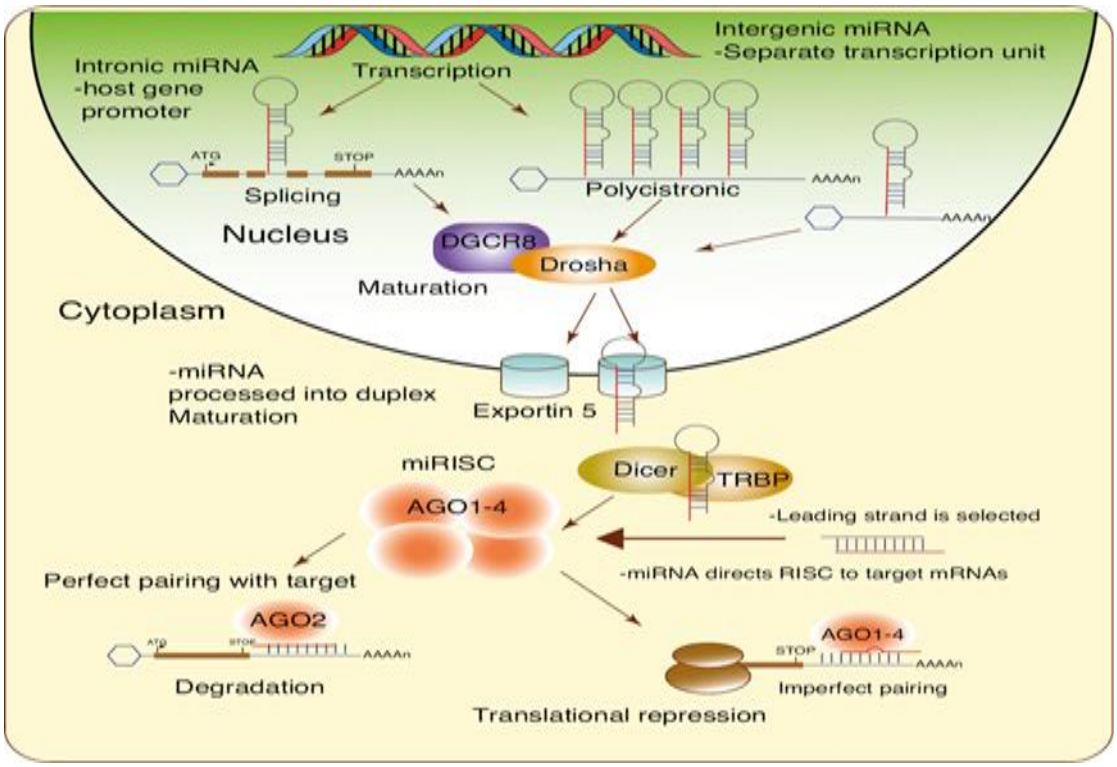
2.10 MikroRNA ve MikroRNA 135a

2.10.1 MikroRNA (miRNA)

MikroRNA ailesi (miRNA), ortak bir atadan türetildiği düşünülen bir miRNA grubudur. Aynı miRNA ailesinin üyeleri benzer fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Bu nedenle, birincil dizide veya ikincil yapıda her zaman korunmazlar. Birincil dizi aileye uygunluk, doğru tanımlama ve yeni miRNA'nın ek işlevsel açıklamaları için yardımcı olmaktadır. MikroRNA, gen ekspresyonuna katılmada önemli rol oynayan küçük, yüksek oranda korunmuş, kodlamayan (21-25 nükleotit içeren) RNA molekülleridir. MikroRNA'lar, RNA polimeraz II ve III tarafından klonlanır ve sonuç olarak, bir dizi bölünme olayına maruz kalan ve sonunda olgun bir mikroRNA oluşturan öncüler üretilir. MikroRNA partikülleri bitkilerde, hayvanlarda ve mRNA'nın tamamlayıcı kısımlarına bağlanarak ve translasyon yoluyla protein oluşumuna müdahale ederek gen ekspresyonunu baskılayan bazı virüslerde bulunmaktadır (Bartel 2018).

MikroRNA'lar embriyo, doku ve hücre gelişimi, hücre farklılaşmasının düzenlenmesi, üreme ve apoptozun yanı sıra insan üremesindeki önemi için çok önemlidir. MiRNA,

serum, plazma ve tükürük dahil olmak üzere çoğu biyolojik sıvılarda olduğu gibi hücrelerde de bulunmaktadır. miRNA'nın biyolojik yolu Şekil 2.6'da gösterilmektedir. Buradan da anlaşılacağı üzere, hücreler miRNA'ları salgıladıklarında, ya mikro veziküller halinde kaynaşırlar ya da proteinlere bağlanırlar. Bu durum onları RNA'nın parçalanmasından korur ve böylece uzun süre bozulmadan kalırlar (Moreno-Moya *et al.* 2014).



Şekil 2.6 MiRNA biyogenez yolu (Terrinoni *et al.* 2019)

2.10.2 MikroRNA 135a

2.10.2.1 microRNA 135a'nın tanımı

MiR-135a (MIRN135-1 veya MIRN135A1 olarak da bilinir), gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan küçük (20-24 nükleotit) kodlamayan bir RNA'dır. Büyük bir omurgalı grubuyla denenmesi sonucunda, nsanlarda, farelerde ve sıçanlarda bulunmaktadır (Kim *et al.* 2004). Bular miR-135a ve miR-135b, adenomatöz polipozis koli geninin (APC) çevrilmemiş 3' bölgesini hedefler. Öncül miRNA (70 nükleotitten

oluşan pre-miRNA), daha kısa (20-24 nükleotit) nükleotitlerin ozmotik bir dizisi olan miRNA-135a'yı üretmek için Dicer enzimi tarafından işlenir. Bu olgun dizi, 5' bölgesi kısmından kesilebilir (Nagel *et al.* 2008).

2.10.2.2 HCV enfeksiyonlu MicroRNA 135a

Tüm miRNome aparatı, hücresel miRNA'lar ve HCV yaşam döngüsü arasında birçok etkileşimle birlikte genom düzeyinde işlevsel bir taramanın yapıldığı HCV enfeksiyonunun varlığından etkilenir (Li *et al.* 2017). HCV ile ilişkili miRNA'lar arasında miR-135a bulunur. miRNA birçok kanserde yaygın olarak yükselir ve HCV ile ilişkili karaciğer karsinogenezi için belirleyici olarak kabul edilir (Van Renne *et al.* 2018). Kültürlenmiş hepatositlerde miR-135a'nın artan ekspresyonu, HCV çekirdek proteininin temel ekspresyonunda ve viral RNA seviyelerinde bir artışla sonuçlanmış olup birincil rolünün HCV enfeksiyonunu modüle etmek olduğunu göstermektedir (Li *et al.* 2017). HCV enfeksiyonunun desteklenmesinde miR-135a'nın kesin rolü bilinmemektedir. HCV'nin miR-135a ekspresyonunu veya fonksiyonunu etkileyip etkilemediği ve bunun virüsün kademeli karaciğer hasarına katkıda bulunup bulunmadığı netlik kazanmamıştır (Sodroski *et al.* 2019).

2.11 Böbrek Hastalıkları

Böbrek diyalizi, kronik böbrek yetmezliği olan bir kişinin böbreği için kurtarıcı bir tedavidir. Bu nedenle diyaliz gerektiğinde sağlıklı insan böbreğinin yerini alır. Hastalar, üre ve kreatinin gibi zararlı maddelerin vücuttan atılması gibi doğal ihtiyaçlarını karşılayamazlar. Kronik böbrek hastalığı sirozun zor bir komplikasyonudur. Son yıllarda, sirozda patojeni ve böbrek yetmezliğinin doğal seyrini anlamaya yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Kronik böbrek hastalığının iki ana nedeni, vakaların üçte ikisine sebep olan diyabet ve yüksek tansiyondur. Diyabet, kan şekeriniz çok yüksek olduğunda meydana gelir ve böbrekler ve kalp dahil olmak üzere vücudunuzdaki birçok organın yanı sıra kan damarları, sinirler ve gözler de hasara neden olmaktadır (Ginès and Schrier 2009).

3. MATERYAL VE METOT

Bazı Iraklı böbrek yetmezliği hastalarında mikro RNA 134a'nın moleküler olarak tespit edilmesi ve HCV'nin bazı immünolojik belirteçlerinin tahminine yönelik gerçekleştirilen bu çalışmada, böbrek yetmezliği çeken bazı Iraklı hastalarda geleneksel PCR Protokolü ile HCV tetkiki, böbrek yetmezliği olan hastalarda HCV'nin immünopatogenezinde IL-17F sitokininin olası rolünün değerlendirilmesi ve son olarak da hastaların serumundaki bazı bağışıklık belirteçlerinin Toll-Benzeri Reseptör Tip -3 (TLR-3) olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3.1 Materyal

3.1.1 Laboratuvar ekipmanları

Bu çalışmada kullanılan araç ve gereçler Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 Kullanılan araç ve gereçler

Araç/ Gereç	Şirket	Menşei
ELISA sistem (okuyucusu ve yıkayıcı)	BioTek	ABD
İnkübatör	GEMINI	ALMANYA
Santrifüj	Hettich	ALMANYA
Mikro Santrifüj	Lbogen	DANİMARKA
PCR Isı Döngüleyici	ThermoFisher	ABD
PCR İş İstasyonu	Cleaver	İNGİLTERE
TermoKarıştırıcı	Bioer	JAPONYA
Mikropipetler 1 – 10 µL	Cleaver	İNGİLTERE
Mikropipetler 5 – 50 µL	Cleaver	İNGİLTERE
Mikropipetler 10 – 100 µL	Cleaver	İNGİLTERE
Mikropipetler 100 – 1000 µL	Cleaver	İNGİLTERE
Kübit 4	Invitrogen	ABD
Buzdolabı	Kelon	KORE
Vorteks	VELP	ALMANYA
Gerçek Zamanlı PCR	Bioer	ÇİN
MX-S Vorteksler	DLab	ÇİN
Quantus	Promega	ABD
EDTA	AFCOVAC	ÜRDÜN
Jel tüp 6 ml	PUTH™	ÇİN
Beyaz tüp	CITOTEST	ÇİN

3.1.2 Kimyasal malzemeler

Çizelge 3.2'de, bu çalışmada kullanılan kimyasalların şirket ve menşei ülkeleri belirterek gösterilmektedir.

Çizelge 3.2 Menşei ile kullanılan kimyasallar

Kimyasal bileşenler	Şirket	Menşei
Mutlak etil alkol (%99,9)	Diamound®	Fransa
Serbest Nükleaz Suyu	NEB®	İngiltere
Trizol	Invitrogen	ABD
İzopropanol	BDH Prolabo	GüneyAfrika
Kloroform	BDH Prolabo	Güney Afrika
Etanol (%99,9)	FTC INDIA	Hindistan

3.1.3 Kit

Çizelge 3.3'te belirtilen kitler, kaynakları ve kökenleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 Açıklama ve menşeleri ile birlikte kullanılan kitler

Ürün Adı ve katalog numarası	Açıklama ve Bileşenler	Şirket ve Menşei
HCV Ab ELISA kit Katalog No:1707-12	1 adet Mikro Kuyu Plakası, 1 Şişe Negatif Kontrol, 1 Şişe Pozitif Kontrol, 1 Şişe Numune Seyreltici, 1 Şişe HRP-Konjugat Reaktifi, 1 Şişe Yıkama Tamponu, 1 Şişe Kromojen çözeltisi-A, 1 Şişe kromojen çözeltisi-B, 1 Şişe Durdurma Çözeltisi (2,0M H_2SO_4), 1 Adet Plastik Sızdırmaz Poşet	AccuDiag™ (ABD)
RT.PCR-HCV Kiti Katalog No: M0020202v027e	dH2O, Prob RT.PCR Karışımı*, RT Karışımı*, Algılama Karışımı 1, Algılama Karışımı 2, Dahili kontrol, Pozitif Kontrol 1 IC Tamponu,HCV Standart 1, HCV Standart 2, HCV Standart 3, HCV Standart 4.	IONTEK FLUORION (Türkiye)
Plazma/Serum Hücresiz Dolaşan ve Viral Nükleik Asit Arıtma Mini Kiti Katolog No: 56300	Lizis Tamponu A, Yıkama Solüsyonu A Elüsyon Tamponu F, Etanol %99,9	NORGEN BIOTEK-CORP (KANADA)

Çizelge 3.3 (Devamı)

Ürün Adı ve katalog numarası	Açıklama ve Bileşenler	Şirket ve Menşei
IL-17F ELISA KIT Katalog No: MBS772100	HRP-Konjugat reaktifi. Substrat A ve Substrat B. Durdurma solüsyonu (2,0M H_2SO_4): Eklendikten sonra nihayet sarıya dönecek ve 450 nm dalga boyunda okunacaktır. Standart A= 0 pg/mL, Standart B= 5 pg/mL, Standart C= 10 pg/mL, Standart D= 20 pg/mL, Standart E= 40 pg/mL, Standart F= 80 pg/ml	MyBioSource (ABD)
TLR3 ELISA KIT Catalog No: MBS3804798	HRP-Konjugat reaktifi. Substrat A ve B, onları ekledikten sonra solüsyon maviye dönecektir. Durdurma solüsyonu (2,0M H2SO4): Eklendikten sonra nihayet sarıya dönecek ve 450 nm dalga boyunda okunacaktır. Standart 1= 0 ng/mL, Standart 2=1,25 ng/mL, Standart 3= 2,5 ng/mL, Standart 4= 5 ng/mL, Standart 5= 10 ng/mL, Standart 6= 20 ng/mL	MyBioSource (ABD)
Qubit™ RNA HS Test Kiti Katalog No: Q32852	Qubit RNA HS Test Kiti, Qubit Florometre ile birleştirildiğinde, Qubit RNA HS Tahlil Kiti, düşük miktarda RNA numunelerini ölçmek için doğru ve seçici bir yaklaşım sağlar. Test, DNA, protein ve serbest nükleotitler hariç RNA için son derece seçicidir. Test, tuzlar, serbest nükleotitler, çözücüler, deterjanlar ve protein gibi yaygın safsızlıkları tolere eder.	ThermoFisher® (ABD)
Qubit™ dsDNA HS Test Kiti Katalog No: Q32851	Qubit dsDNA HS (Yüksek Hassasiyet) Test Kiti, Qubit Florometre düşünülerek oluşturulmuştur. RNA üzerinde, tahlil dsDNA için çok seçicidir.	ThermoFisher® (ABD)
Luna Üniversal qPCR MasterMix Katalog No:M3003S	NEB Luna Universal qPCR Master Mix, çoğu gerçek zamanlı qPCR ekipmanının SYBR®/FAM kanalını kullanarak gerçek zamanlı qPCR tespiti ve hedef DNA dizilerinin miktar tayini için özel olarak hazırlanmış 2X reaksiyon karışımıdır. Bir dizi cihaz platformuyla uyumlu ve Hot Start Taq DNA Polimeraz içeren benzersiz bir pasif referans boya ile geliştirilmiştir.	NEB (İngiltere)
ProtoScript® İlk zincir cDNA'sı Sentez Kiti Katalog No: E6300S	ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit, iki optimize edilmiş karışım içerir, M-MuLV, Enzim Karışımı ve M-MuLV Reaksiyon Karışımı. M-MuLV Enzim Karışımı, M-MuLV Ters Transkriptaz ve Murin RNaz İnhibitörünü birleştirir, M-MuLV Reaksiyon Karışımı ise dNTP'ler ve optimize edilmiş bir tampon içerir.	NEB (İngiltere)

3.1.4 Primerler

Bu çalışmada kullanılan tüm primer kaynaklar macrogen®'den (Kore) elde edilmiştir. Aşağıdaki Çizelge 3.4'te, öneklerin kaynaklarıyla birlikte açıklamaları yer almaktadır.

Çizelge 3.4 Primerlerin adı ve kaynakları

Primer Adı	Sıralaması	Kaynaklar
MiR-135a	miR-135a-RT: 5‘-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGACTGGATACGACTCACATA-3′ miR-FP: 5‘-GGCGTATGGCTTTTTATTCCTATG TGA-3′ miR-RP: 5‘-GTGCAGGGTCCGAGGT -3′	Zhou *et al.* (2020) Ardalan *et al.* (2020)
RNU6-1	U6-FP (CTCGCTTCGGCAGCACA) U6-RP (AACGCTTCACGAATTTGCGT)	Ardalan *et al.* (2020)
IL-17F	F- GCTGCTGTCGATATTGGGGCTT R- ACTGGGCCTGTACAACTTCCGA	Yeni Tasarlandı
Beta- actin	F- ATGCTTCTAGACGGACTGCG R- GTTTCAGGAGGCTGGCATGA	GenBank accession no. XM_00357928 Benson *et al.* (2015)

3.2 Örnek Toplama Yöntemi

3.2.1 Çalışma grupları

Çalışma dört grubu içermektedir:

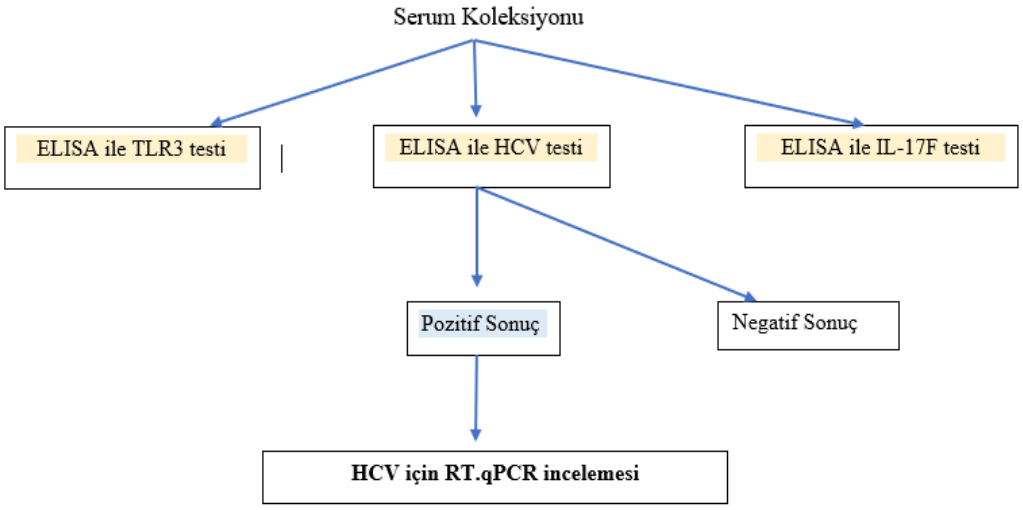
1. Grup-1: Bu grup çalışmanın hedef grubu olup, hepatit C virüsü ile enfekte böbrek yetmezliği (böbrek yetmezliği) olan 78 hastadan oluşmaktadır.
2. Grup-2: Bu grup, sadece HCV ile enfekte, böbrek yetmezliği olmayan 60 kişiden oluşmaktadır.
3. Grup-3: Bu grup, 40 sağlıklı insanı içeren bir kontrol grubu olarak kabul edilmiştir.
4. Grup-4: Bu grup 20 hastayı ve HCV enfeksiyonu olmayan sadece böbrek yetmezliği olan hastaları içermektedir.

Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan gruplar

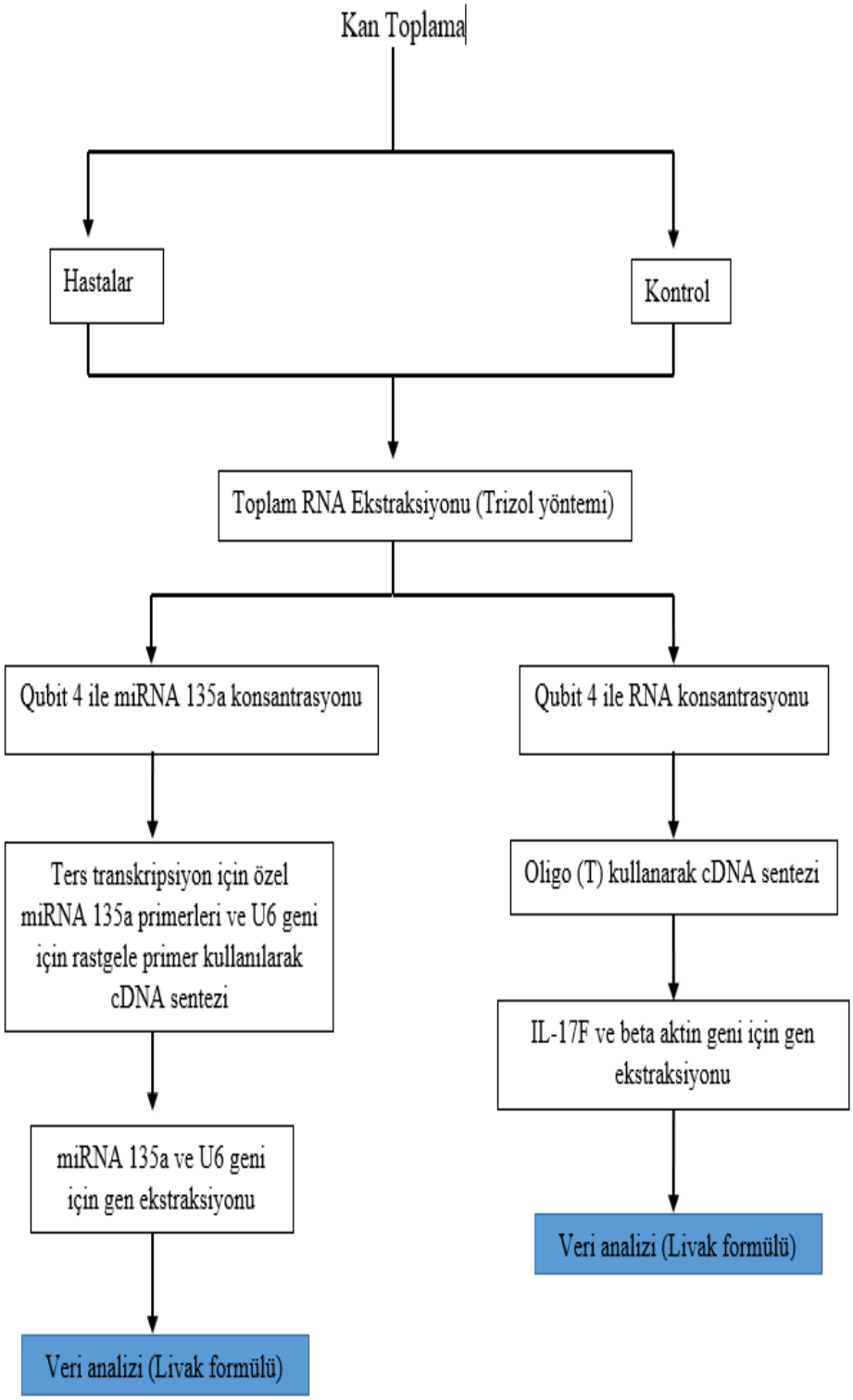
Grup 1	HCV ile enfekte böbrek yetmezliği hastaları
Grup 2	HCV ile enfekte ve böbrek yetmezliği olmayan bireyler
Grup 3	Sağlıklı insanlar
Grup 4	HCV enfeksiyonu olmayan böbrek yetmezliği hastaları

3.2.2 Kan örneği toplama

5 mL venöz kan alınarak; IL-17F için RT.qPCR ve miRNA 135a için RT.qPCR için dört antikoagülan EDTA tüpüne (0,5 mL) 2 mL yerleştirilmiştir. Daha sonra, kalan kan hacmi (3 mL), immünolojik testler (Anti HCV-Ab, IL-17F ve TLR3) ve gerçek zamanlı PCR HCV amacıyla tüplere (jel tüp) konulmuştur. Tüplerdeki kan pıhtılaşana kadar laboratuvarda bekletilmiştir. Daha sonra 3000 rpm'de santrifüje edilmiştir. Serum ayrılarak tüplere (beyaz tüp) yerleştirilmiştir. Örnekler kullanılıncaya kadar -20°C'de bekletimiştir. kan ve serum numunelerinin alınma yöntemi Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



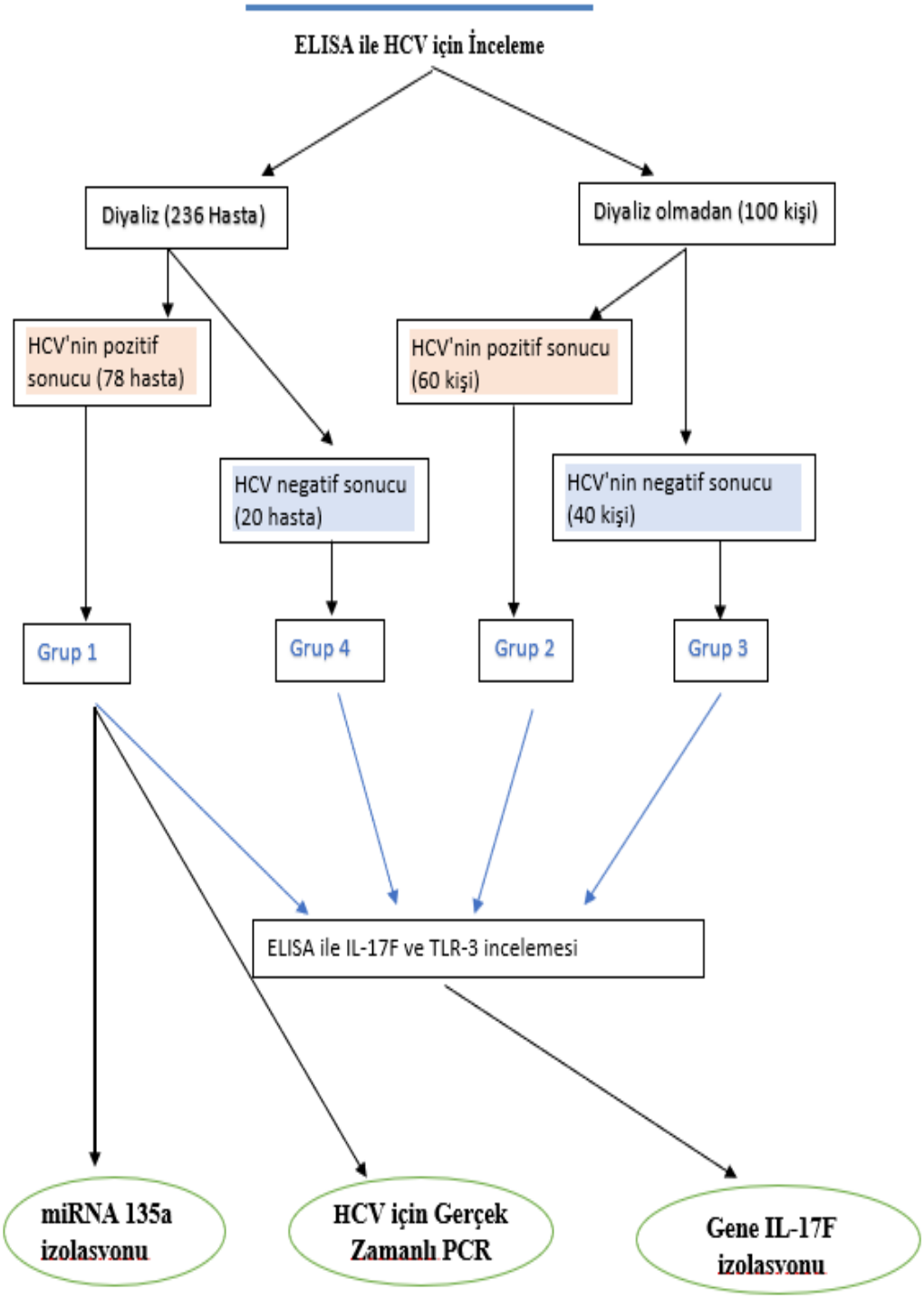
Şekil 3.1 Kan serumu örnek toplama şeması



Şekil 3.2 Kan toplama şeması

3.2.3 Çalışma tasarımı

Doğru sonuca ulaşmak için belirlenen çalışma tasarımı Şekil 3.3'te gösterilmektedir.



Şekil 3.3 Tasarımı çalışma şeması

3.3 Çalışma Yöntemleri

3.3.1 ELISA ile anti-HCV Ab'nin incelenmesi

3.3.1.1 Hazırlama

1. Tüm reaktifler, standartlar, kontroller oda sıcaklığına (18-25˚C) getirilmiştir.
2. Konsantre yıkama solüsyonu kullanımdan önce 1:20 oranında seyreltilmiştir. 50 mL konsantre yıkama solüsyonunu 950 mL distile su ile karıştırarak nihai hacim 1000 mL seyreltilerek yıkama tamponu elde edilmiştir.

3.3.1.2 Yöntem

1. A1 dışındaki tüm kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş numune eklenmiştir.
2. Üç çukura (B1, C1, D1) 10 µl negatif kontrol eklenmiştir.
3. İki deliğe (E1, F1) 10 µl pozitif kontrol eklenmiştir.
4. Daha sonra İncelemek istediğimiz numunelerden (hasta serumu) 10 µl sonraki çukura eklenmiştir.
5. Bu noktada plate 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
6. Kuluçka süresi bittikten sonra plate kuluçka makinesinden çıkartılmış olup daha sonra 5 kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi ELISA çamaşır (washer) makinesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
7. Plate filtre kağıdı ile kurutularak ardından çukurlara A1 (boş) hariç 100 µl anti-human IgG-HRP enzimi eklenmiştir.
8. Plate 30 dakika boyunca 37°C'de kuluçka makinesine yerleştirilmiştir.
9. Belirtilen süre geçtikten sonra Adım 6 defa tekrarlanmıştır.
10. Her bir deliğe 50 µl kromojen A ve 50 µl kromojen B solüsyonu eklenmiştir.
11. Plate karanlık bir yerde 37°C'de 15 dakika inkübatöre yerleştirilmiştir.
12. Tüm pipetlere 50 µl durdurma solüsyonu (H_2SO_4) eklenmiştir.
13. Beş dakika sonra 450 nm'de absorbansı okunmuştur.
14. Son değeri eğri grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.2 İnsan interlökin 17F'nin (IL-17F) ELISA ile incelenmesi

3.3.2.1 Reaktiflerin hazırlanması

720 mL distile deiyonize suya 1:25 oranında Yıkama tamponu (30 mL) eklenerek 750 mL'lik bir yıkama tamponu hazırlanmıştır.

3.3.2.2 Yöntem

1. Çalışmaya başlamadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığında hazırlanmıştır.
2. Çukurlara 50 µl standart sırasıyla A1, B1, C1, D1, E1 ve F1 eklenmiştir.
3. Daha sonra pipetlere 10 µL numune (hasta serumu) eklenmiştir.
4. Test örneklerine 40 µL seyreltici eklenmiştir.
5. Daha sonra, tüm çukurlara (standart çukurlar ve test örneği çukurları) 100 µL HRP-konjugat reaktifi eklenmiştir.
6. Plate iyice kapanarak, ardından plaka 37°C'de 60 dakika inkübatöre yerleştirilmiştir.
7. İnkübasyon süresi bittikten sonra kab delik başına 350 µl ile 5 kez yıkanmıştır.
8. Plate filtre kağıdı kullanılarak kurutulmuştur.
9. Her bir kuyucuğa 50 µl kromojen solüsyon A ve ardından her kuyucuğa 50 µl kromojen solüsyon B eklenmiştir.
10. Plate ışıktan uzakta 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
11. Reaksiyonu durdurmak için her çukura 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiştir.
12. On dakika sonra 450 nm'de absorbans okunarak en son grafik ile bereber değeri hesaplanmıştır.

3.3.3 ELISA'ya göre insan benzeri reseptör 3 (TLR3)

3.3.3.1 Reaktiflerin hazırlanması

720 mL distile deiyonize suya 1:25 oranında Yıkama tamponu (30 mL) eklenerek 750 mL'lik bir yıkama tamponu hazırlanmıştır.

3.3.3.2 Yöntem

1. Çalışmaya başlamadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığında hazırlanmıştır.
2. Çukurlara 50 µl standart sırasıyla A1, B1, C1, D1, E1 ve F1 eklenmiştir.
3. Daha sonra pipetlere 10 µL numune (hasta serumu) eklenmiştir.
4. Test örneklerine 40 µL seyreltici eklenmiştir.
5. Daha sonra, tüm çukurlara (standart çukurlar ve test örneği çukurları) 100 µL HRP-konjugat reaktifi eklenmiştir.
6. Plate iyice kapanarak, ardından plaka 37°C'de 60 dakika inkübatöre yerleştirilmiştir.
7. İnkübasyon süresi bittikten sonra kab delik başına 350 µl ile 5 kez yıkanmıştır.
8. Plate filtre kağıdı kullanılarak kurutulmuştur.
9. Her bir kuyucuğa 50 µl kromojen solüsyon A ve ardından her kuyucuğa 50 µl kromojen solüsyon B eklenmiştir.
10. Plate ışıktan uzakta 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
11. Reaksiyonu durdurmak için her çukura 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiştir.
12. On dakika sonra 450 nm'de absorbans okunarak en son grafik ile bereber değeri hesaplanmıştır.

3.3.4 HCV için gerçek zamanlı PCR testi

HCV ile enfekte olmuş serumdan RNA ekstraksiyonu

1. 200 µL serumu 2 mL'lik tüpe koyulmuştur.
2. 600 µL lizis solüsyonu A eklenmiştir.
3. Malzemeler 10 saniye çevrilerek iyice karıştırılmıştır.
4. Ardından 800 µL %96 etanol eklenmiştir.
5. Malzemeler 10 saniye çevrilerek iyice karıştırılmıştır.
6. Daha sonra 2. adımdaki karışımın 650 µL'sini ince bir eğirme kolonuna aktarılmıştır.
7. 3300 x g'de (~6000 rpm) 2 dakika santrifüjlenmiştir.
8. Akış ve kolonu toplama tüpü kullanarak ayrılmıştır.
9. Adım 3 iki kez daha yapıldıktan sonra, adım 2'deki tüm karışım microspin kolonuna aktarılmıştır.

10. Daha sonra kolonu 400 µL Yıkama Solüsyonu A ile doldurularak 30 saniye boyunca 3300 x g'de santrifüj edilmiştir (yaklaşık 6600 rpm).
11. Akış kaldırılarak kolon toplama tüpü ile değiştirilmiştir.
12. Toplam üç yıkama için 5. adım iki kez daha tekrarlanmıştır.
13. Kolektör tüpü çıkarılarak kolon 13000 x g'de (14000 rpm) 3 dakika boş çalkalanmıştır.
14. Mil yeni bir 1,7 mL durulama tüpüne aktarılmıştır.
15. Kolon üzerine 10 - 25 µL durulama solüsyonu F eklenmiştir.
16. Oda sıcaklığında iki dakika bekletilmiştir.
17. Daha sonra 1 dakika 400 x g'de (2000 rpm) santrifüj, ardından 2 dakika 5800 x g'de (yaklaşık 8000 rpm) santrifüj yapılmıştır.
18. Çıkarılan tampon kolona geri konularak 2 dakika oda sıcaklığında bırakılmıştır.
19. Ardından, 1 dakika boyunca 400 x g'de (2000 rpm) ve ardından 2 dakika boyunca 5800 x g'de (yaklaşık 8000 rpm) bir santrifüj uygulanmıştır.

RT.PCR protokolü

1. Serumdan RNA'yı çıkardıktan sonra protokolde belirtilen ve aşağıdaki Çizelge 3.6'da gösterilen ölçülere göre aşağıdaki malzemeler eklenmiştir. Böylece RNA'yı gerçek zamanlı PCR makinesinde okunacak şekilde cDNA haline çevrilmiştir.

Çizelge 3.6 PCR'ye eklenen PCR reaksiyon hacimleri dahili kontrolü

Maddeler	**Hacim**
PCR Karışımı	12,5 µL
RT Karışımı	0,25 µL
Algılama Karışımı 1	1,5 µL
Algılama Karışımı 2	1,5 µL
Dahili kontrol	1 µL
dH2O	3,25 µL
Örnek RNA Standart Negatif/Pozitif Kontrol	5,0 µL
Toplam Ses	25,0 µL

2. Her numunenin toplam hacmi (numuneler/harici standart/negatif kontrol) bir Eppendorf tüpüne yerleştirilip sıkıca kapatılmıştır.
3. Tüpler üzerinde delik bırakmadan kapağın sıkıca kapatıldığından ve solüsyonun her tüpte olduğundan emin olunmalıdır.
4. HCV için gerçek zamanlı PCR programı daha sonra Çizelge 3.7'de gösterilen özel protokol kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.7 PCR Programı

No	Adım	Sıcaklı	Süre	Döngü
1	Ters transkripsiyon	50 °C	30:00 dak.	1
2	İlk denatürasyon	95 °C	15:00 dak.	1
3	Denatürasyon	94 °C	00:20 dak.	50
	Veri Toplama	60 °C	01:00 dak.	
4	Sonsuz Tutma	22 °C	∞	

3.3.5 RNA izolasyonu

Kandan TRIzol™ ile RNA izolasyonu

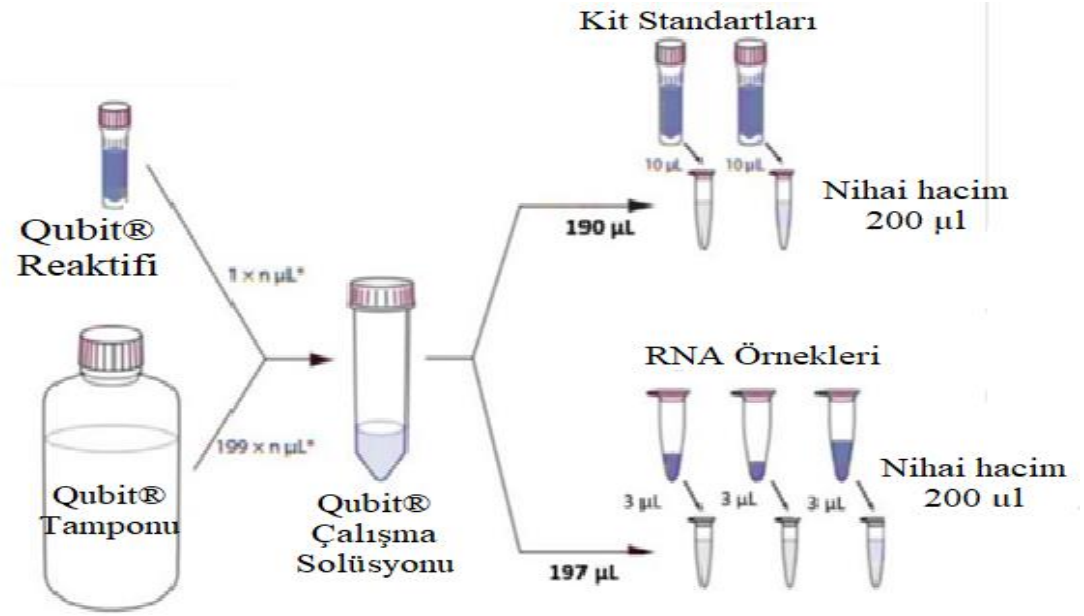
1. Her 0,5 mL'lik kan örneğine 0,75 mL TRIzol™ eklenerek homojenleştirme amacıyla birkaç kez yukarı ve aşağı döndürülmüştür.
2. Nükleoprotein kompleksinin tamamen ayrışmasına izin vermek için beş dakikalık bir inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
3. Lizis için kullanılan 0,15 mL kloroform TRIzol™ reaktif eklenmiştir.
4. Tüp 2 – 3 dakika inkübe edilmiştir.
5. Karışım, alt fenol kloroform kırmızısı, bir interfaz ve renksiz bir üst sulu faza ayrılana kadar numune 12000 x g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir.
6. Yeni bir tüpe aktarılan RNA'yı içeren sulu faz elde edilmiştir.
7. RNA, sulu faza 0,45 mL izopropanol eklenerek çökeltilmiştir.
8. Daha sonra karışım 10 dakika inkübe edilmiştir.

9. İnkübasyondan sonra 12000 x g'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Daha sonra tüpün dibinde beyaz jöle benzeri granüller şeklinde bir RNA çökeltisi oluşmuştur.
10. Bir mikropipet kullanarak süpernatant çıkarılmıştır.
11. Süpernatant 0,75 mL %75 etanol içinde yeniden süspanse edilmiştir.
12. Daha sonra peleti eritmek için 5 dakika 7500 x g'de santrifüj edilmiştir.
13. Süpernatant mikropipet ile çıkarılmıştır.
14. RNA granüllerini kurutmak için tüp 15 dakika açık bırakılmıştır.
15. Elde edilen pelet 20 µL RNaz içermeyen su ile süspanse edilerek termomikser ile 60ºC'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
16. Toplam RNA örnekleri -20ºC'de saklandı.

Qubit 4,0 ile RNA miktar tayini

Test kiti, 10 pg/µL'den 100 ng/µL'ye kadar olan ilk numune konsantrasyonları için oldukça seçicidir ve doğrudur. Test oda sıcaklığında gerçekleştirilir ve sinyal 3 saat boyunca stabildir. Tuzlar, serbest nükleotitler, çözücüler, deterjanlar veya protein gibi yaygın kirleticiler, tahlilde iyi tolere edilir. Standart ve uygulama prosedürü Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

1. Qubit® çalışma solüsyonu, Qubit® RNA HS Reaktifi Qubit® RNA HS tamponunda 1:200 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
2. Standart olarak tasarlanan her tüpe Qubit® çalışma solüsyonundan 190 µL hacim eklenerek sağlanan her standart solüsyondan 10 µL aynı tüplere ilave edilip vortekslenmiştir. Böylece, yeni hacim 200 µL olmuştur.
3. Numune için hazırlanan her tüpe 197 µL olarak Qubit® çalışma solüsyonu ve 3 µL numune tek tek eklenmiştir. Böylece, hacim 200 µL olmuştur.
4. Tüm bileşim vortekslenerek oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir.
5. Qubit cihazına konsantrasyon eğrisi oluşturmak için standartlar tüpleri yerleştirilmiştir.
6. Her numunedeki RNA konsantrasyonunu okumak için numune tüpleri tek tek eklenmiştir.



Şekil 3.4 Qubit 4 ile nükleik asit ölçümü için stadart prosedür

Farklı standartlar ve reaktiflerin kullanılması dışında cDNA ölçümü için aynı prosedür kullanılmış olsa da geri kalan adımlar tamamen benzerdir.

RNA ekstraksiyonu

RNA'nın çıkarılmasını tamamlandıktan sonra, IL-17F için Gerçek Zamanlı PCR ve miRNA 135a için RT.qPCR protokolü kullanılmıştır.

3.3.6 IL-17F için gerçek zamanlı PCR

RT.qPCR protokolü

Bu, aşama iki kısma ayrılmaktadır:

Protokolün ilk kısmı: oligo (T) sentez dizisi ve protoscript cDNA aracılığıyla mRNA'nın sentezi (cDNA) gerçekleşmektedir. Bu prosedürde aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. Her bir ekstrakte edilen toplam RNA örneğinden 5 µl yeni PCR tüpüne eklenmiştir.
2. Her numune için 10 µL olarak eklenen dNTP'ler, tampon ve diğer temel bileşenleri içeren Protoscript reaksiyon karışımı elde edilmiştir.
3. MuLV Enzim daha sonra reaksiyona numune başına 2 µl olarak eklenmiştir.
4. Oligo (T)23'ten önce 2 µl eklenerek ve sonra 1 µL daha eklenerek hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.
5. Bu karışım, ısı döngüleyici kullanılarak 42 ºC'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra enzim inaktivasyonu için 80 ºC'de inkübe edilmiştir. cDNA ürün ölçümü de Qubit 4,0 aracılığıyla yapılarak ikinci adım olan göreceli kantitatif PCR gerçekleştirilinceye kadar saklanmıştır.

Protokolün ikinci kısmı: Aynı çalışmada hastadan ve seçim kontrolünden olmak üzere bir numune (cDNA) bulunmaktadır. Her numunede biri ilgilenilen gen IL-17F ve ikincisi beta-katenin için olmak üzere iki PCR tüpü bulunur. Çalışmamızda, gen, Sybergreen'in floresan gücüne dayalı inceleme yoluyla tanımlanmıştır. Reaksiyon karışımı ve miktarları Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8 Reaksiyon karışımının bileşenleri

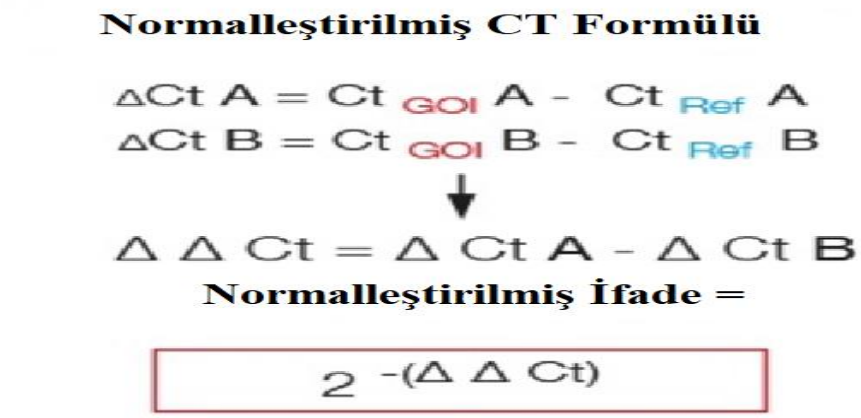
Bileşen	20 µL Reaksiyon
Luna Universal qPCR Master Mix	10 µL
Oligo $(T)_{23}$	2 µL
DNA Şablonu	5 µL
Nükleazsız Su	3 µL

Kabarcıkları gidermek ve sıvı toplamak için PCR tüplerinin hızlı döndürülmesinin (2000g'de 1 dakika), ardından Çizelge 3.9'da gösterildiği gibi spesifik ısı döngüleyici protokolü kullanılarak bir Gerçek Zamanlı PCR programı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.9 Gerçek Zamanlı PCR için ısı döngüleyici protokolü

Döngü Adımı	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	60 sn.	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	40 – 45
Uzatma	60°C	30 sn (+Plaka okuması)	
Erime Eğrisi	60 – 95 °C	40 dak	1

Elde edilen sonuçlar, Şekil 3.5'te gösterildiği gibi Livak formülü ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.5 Livak formülü

3.3.7 miRNA 135a için RT-qPCR protokolü

Bu yöntem iki aşamaya ayrılmıştır:

Birinci aşama: cDNA sentezi, Çizelge 3.8'de belirtildiği gibi miRNA 135a için spesifik primer ve birincil (cDNA) sentez grubu aracılığıyla miRNA'dan gerçekleştirilmiştir. Bu prosedürde aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. Her bir ekstrakte edilen toplam RNA örneğinden 5 µl yeni PCR tüpüne eklenmiştir.
2. Her numune için 10 µL olarak eklenen dNTP'ler, tampon ve diğer temel bileşenleri içeren Protoscript reaksiyon karışımı elde edilmiştir.

3. MuLV Enzim daha sonra reaksiyona numune başına 2 µl olarak eklenmiştir.
4. Oligo (T)23'ten önce 2 µl eklenerek ve sonra 1 µL daha eklenerek hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.
5. Bu karışım, ısı döngüleyici kullanılarak 42 ºC'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra enzim inaktivasyonu için 80 ºC'de inkübe edilmiştir. cDNA ürün ölçümü de Qubit 4,0 aracılığıyla yapılarak ikinci adım olan göreceli kantitatif PCR gerçekleştirilinceye kadar saklanmıştır.

İkinci aşama: Aynı çalışmada hastadan ve seçim kontrolünden olmak üzere bir numune (cDNA) bulunmaktadır. Her bir numunede hedef miRNA 135a için iki PCR tüpü bulunmaktadır. Bunlardan biri U6 snRNA içindir. CyberGreen'in floresan gücüne dayalı nicel algılama ile gen tespiti yapılmıştır. Reaksiyon karışımı ve miktarları Çizelge 3.9'da gösterilmiştir.

3.4 İstatistik

İstatistiksel analizler SPSS 25 versiyonu kullanılarak yapılmıştır. Tüm veriler parametriktir ve farklı gruplar arasında karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA testi ile yapılmıştır. Ayrıca belirli gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için karşılaştırma testi yapılmıştır. Sonuçlar, ortalama ± standart sapması (ortalama ± SD) olarak belirtilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 ELISA ile HCV Antikor Testi Sonuçları

Çizelge 4.1 çalışma gruplarının yüzdesini göstermektedir. Böbrek yetmezliği olan 98 hastada (diyaliz ünitesi) HCV antikorları incelenmiştir. Ayrıca diyaliz ünitesi dışından 100 kişi test edilmiştir. Bunlar aşağıdaki dört gruba ayrılmıştır;

1. Ramadi Hastanesi'nde (Irak) 78 enfekte hasta (anti-HCV antikorları pozitif sonuç) saptanmış ve bu grup, grup-1 olarak kabul edilmiştir.
2. Enfeksiyonu doğrulamak ve enfekte olmayan bireyleri tespit etmek için 60 kişi HCV antikorları ile taranmıştır ve bu grup-2'yi oluşturmaktadır.
3. Hepatit C virüsü enfeksiyonundan korunmak için 40 sağlıklı kişin belirlenmiştir (böbrek yetmezliği ve HCV enfeksiyonu olmayan). Bu grup-3 olarak belirlenmiştir.
4. Böbrek yetmezliği olan 20 hasta (HCV karşı antikorlar için negatif sonuç) grup-4 olarak kabul edilmiştir. Çizelge 4.1'de gruplardaki dağılıma göre belirlenen frekanslar ve yüzdelerin dağılımını gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Grup dağıtımı

Grup		No	Yüzde
Grup 1	HCV ile enfekte böbrek yetmezliği	78	39,4
Grup 2	böbrek yetmezliği olmaksızın enfekte HCV	60	30,3
Grup 3	Sağlıklı birey	40	20,2
Grup 4	HCV ile enfekte olmayan böbrek yetmezliği	20	10,1
Toplam		198	100

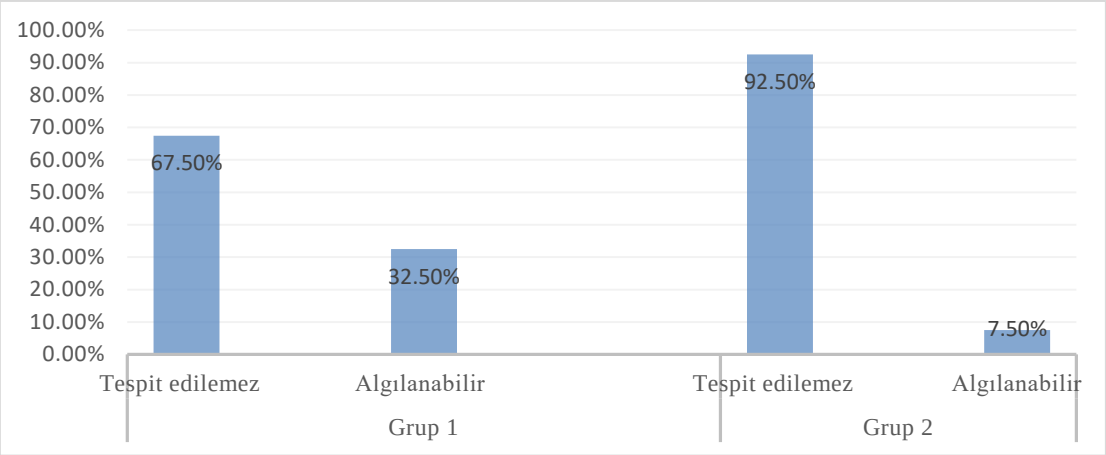
4.2 HCV için Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizinin Sonuçları

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1, HCV için gerçek zamanlı kantitatif PCR görüntüleri göstermektedir. Grup-1 ve grup-2, ELISA ile HCV antikoru için pozitif bir sonuç vermesine rağmen, HCV için gerçek zamanlı PCR, grup-1 için %67,5 ve grup-2 için

%92,5 negatif değer almıştır. Buna göre bu kişilerin virüse karşı tedaviye ihtiyacı yoktur. Bu analiz hasta vakaların takibinde önemli bir role sahiptir ve bu nedenle periyodik olarak yapılması önerilmektedir (Strassl *et al.* 2015). Grup-1'de tespit edilen değer (%32,5), grup-2'de tespit edilene göre (%7,5) daha yüksektir. Elde ettiğimiz bu enfeksiyon yüzdeleri Sułowicz'in çalışmasıyla uyumluluk göstermiştir (Sułowicz *et al.* 2007). İki grup arasındaki değişken oranlar, böbrek hastalığı ve kronik hastalıkları (diabetes mellitus, yüksek tansiyon) olan hastaların bağışıklığının zayıf olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca viral hepatit enfeksiyonu, böbrek hasarına neden olmaktadır (Barsoum *et al.* 2017). Bu, böbreklerde bağışıklık komplekslerinin (immune-complexes) ve kriyoglobulin oluşumuna yol açmaktadır. Bu durum, grup-1'deki yüksek enfeksiyon insidansını açıklamaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda RT.qPCR-HCV güvenilir bir belirteç olarak kabul edilmektedir ve hepatit C tedavisinde de büyük önem taşımaktadır (Aida *et al.* 2018, Swellam *et al.* 2011). RT.qPCR ve ELISA karşılaştırıldığında, çalışmamızda olduğu gibi doğruluk açısından HCV için RT.qPCR yapılması tercih edilmelidir (Tashkandy *et al.* 2007).

Çizelge 4.2 HCV için gerçek zamanlı kantitatif PCR analiz sonuçları

			GRUP		
			Grup1	Grup 2	Toplam
RT.PCR-HCV	negatif (Undetectable)	Sayı	52	37	89
		Grup içindeki %	67,5	92,5	76,1
	Pozitif (Detectable)	Sayı	26	3	29
		Grup içindeki %	32,5	7,5	23,9
Toplam		Sayı	78	40	118
		Grup içindeki %	100	100	100



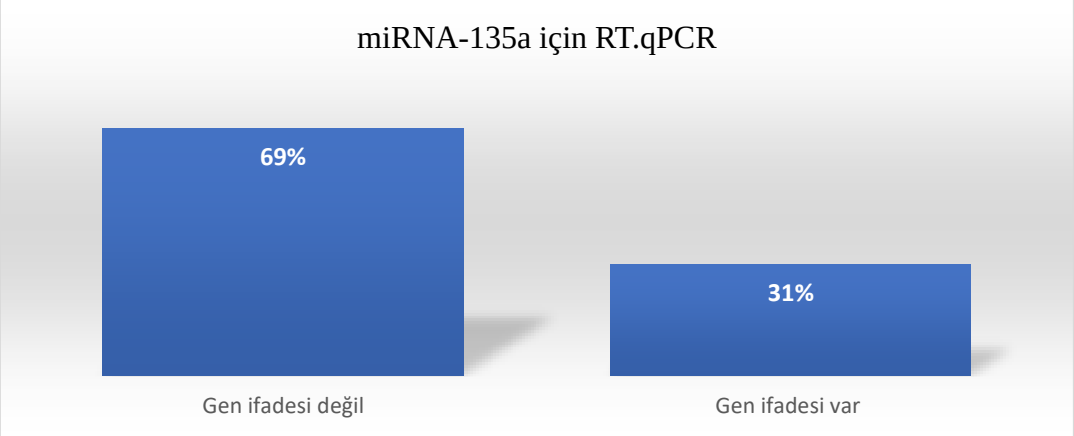
Şekil 4.1 HCV için Gerçek Zamanlı kantitatif PCR analizinin sonuçları

4.3 MicroRNA 135a için Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizinin Sonuçları

Çalışmamızda microRNA-135a sadece grup-1'de incelenmiştir ve diyaliz hastalarının %31'unda gen ekspresyonu tespit edilmiştir. Grup-1'deki hastaların HCV için Gerçek Zamanlı kantitatif PCR sonuçları %32,5'dir. Bu durum, HCV ne kadar aktifse (veya ne kadar tekrarlanabilirse), mikroRNA-135a için o kadar fazla gen ekspresyonu olduğu anlamına gelmektedir olarak yorumlanabilir. Aynı zamanda bu durum Hepatositlerdeki HCV enfeksiyonunun, genomun ve hücresel sinyal yollarıyla ilişkili genlerin doğrudan hedeflenmesi yoluyla yaşam döngülerini düzenlemede konakçı mikroRNA'nın yaygın bir şekilde bozulmasına yol açtığını açıklar ve bu, Brochado-Kith çalışması ile uyumludur (Brochado-Kith *et al.* 2019). mikroRNA-135a geni, kodlama yapmayan kısa (20-24 nükleotit) bir nükleotittir. Viral replikasyon durumlarında mikroRNA-135a'nın varlığına ilişkin açıklamanın güçlendirilmesi, HCV-host etkileşimlerinin sonucudur ve mRNA biyolojisini HCV başlangıcına bağlayan moleküler yolları ortaya çıkarmaktadır (Çizelge 4.3). Elde edttiğimiz bu sonuç Sodroski çalışmasıyla uyumluluk göstermektedir (Sodroski *et al*. 2019).

Çizelge 4.3 mikroRNA-135a için gen ekspresyonu sonuçları

		Yuzde
MiRNA- 135a için RT.qPCR	Gen ifadesi değil	69,0%
	Gen ifadesi var	31,0%



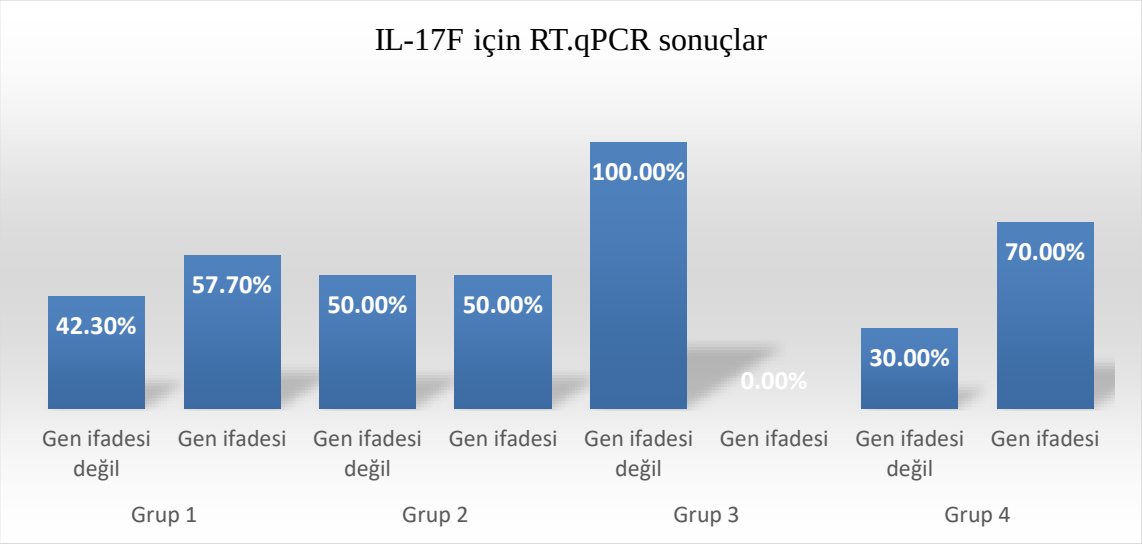
Şekil 4.2 mikroRNA-135a için gerçek zamanlı kantitatif PCR sonuçları

4.4 IL-17F için Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizinin Sonuçları

Çizelge 4.4, grup-4'te IL-17F gen ekspresyonunun yüzdesinin %70 olduğunu gösterilmektedir. Bunun durum, böbreklerdeki büyük hasar nedeniyle böbrek yetmezliği olan hastaların sık sık mikrobiyal enfeksiyonlara neden olduğu göstermektedir. Ayrıca kronik böbrek iltihabı böbrek yetmezliğine yol açar. Sonuç olarak IL-17F, böbrekteki doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkilerinde sonraki birçok süreci düzenleyen enflamatuar ortamda oluşur (Shabgah *et al.* 2014). Gen ekspresyon yüzdesi grup-1'de %57,7 ve grup-2'de %50 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca grup-3'te (sağlıklı insanlar) gen ifadesi bulunmamıştır. Bu durum viral enfeksiyonun yardımcı Th-17 hücrelerini IL-17 üretmesi için uyarması şeklinde açıklanabilir. Bu nedenle, IL-17F, HCV enfeksiyonu için önemli bir biyobelirteçtir (Wu *et al.* 2017).

Çizelge 4.4 IL-17F için gerçek zamanlı kantitatif PCR analiz sonuçları

			GRUP				Toplam
			Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	
IL-17F için RT.qPCR	Normal	Sayı	33	30	40	6	109
		Grup içindeki %	42,3	50,0	100,0	30,0	55,1
	Gen ifadesi	Sayı	45	30	0	14	89
		Grup içindeki %	57,7	50,0	0,0	70,0	44,9
Toplam		Sayı	78	60	40	20	198
		Grup içindeki %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0



Şekil 4.3 IL-17F için gerçek zamanlı kantitatif PCR analizinin sonuçları

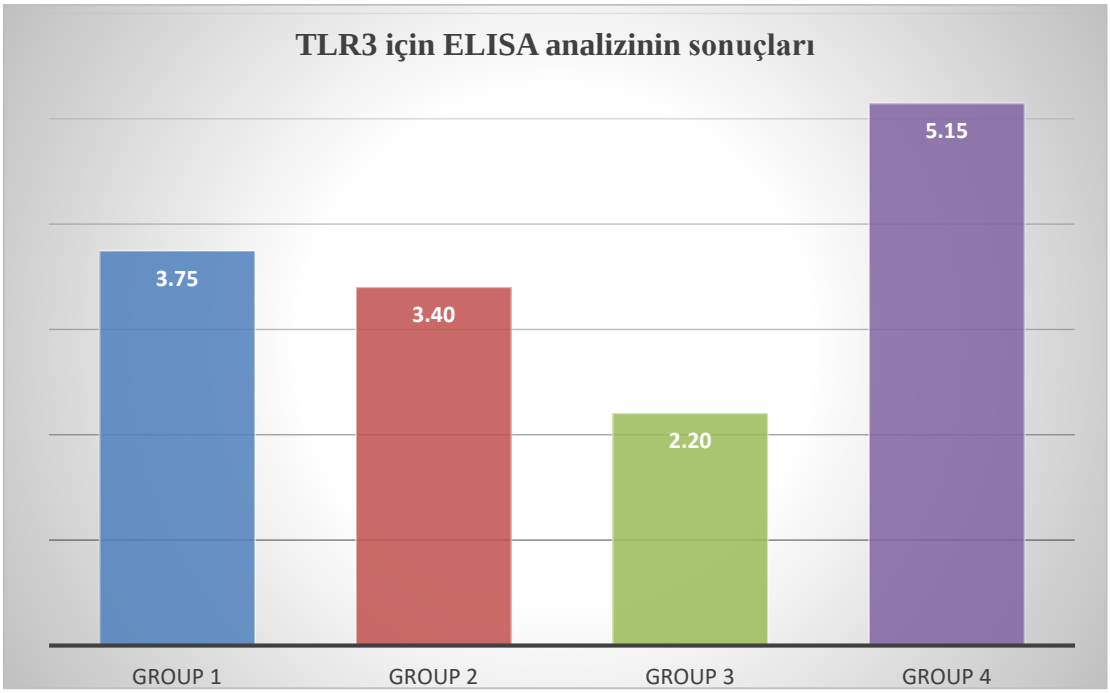
4.5 ELISA ile TLR-3 Analizinin Sonuçları

ELISA tekniğinin kullanıldığı sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir. Buna göre grup-4'te, grup-3'e (sağlıklı insanlar) göre TLR3 konsantrasyonunda artış olduğu görülmektedir. Bu sonuç, böbrek yetmezliğinin böbreklerde tekrarlayan iltihaplanmaya neden olması, doğuştan gelen bağışıklık sistemini enfeksiyon ve yaralanmalara karşı uyarması ve tanımada önemli rolü olan TLR'yi (TLR3 dahil) serbest bırakmaya çalışması olarak açıklanabilir. Elde ettiğimiz sonuç Smith çalışmasıyla uyumluluk göstermektedir (Smith 2009). Grup-2'de sağlıklı deneklere kıyasla TLR3 konsantrasyonunda artış

olmuştur. Bu durum da, HCV'nin karaciğer hücrelerini enfekte etmesi ve karaciğer hücrelerine girmek için konağın hücrelerinde TLR3 olan reseptörlerin bulunması gerekliliği olarak açıklanabilir (Li *et al.* 2012). Ayrıca grup-1 de tespit edilen TLR3 konsantrasyonundaki artış grup-4 ve grup-2'de tespit edilen artışın nin nedenleri ile benzerdir. Bu nedenle TLR3, böbrek yetmezliği ve HCV'si olan hastalar için önemli bir biyobelirteç olarak kabul edilebilir (Morales *et al.* 2012; El-Shimy *et al.* 2018).

Çizelge 4.2 TLR3 için tanımlayıcı istatistikleri

	Grup	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama için %95 Güven Aralığı		Minimum	Maximum
				Alt sınır	Üst Sınır		
ELISA ile TLR3	Grup 1	3,7495	1,31741	3,4525	4,0466	1,03	8,90
	Grup 2	3,4032	0,41555	3,2958	3,5105	2,79	4,17
	Grup 3	2,2035	1,48606	1,7282	2,6788	0,00	4,60
	Grup 4	5,1473	6,72051	2,0020	8,2925	2,20	24,75
	Toplam	3,4734	2,48333	3,1254	3,8215	0,00	24,75



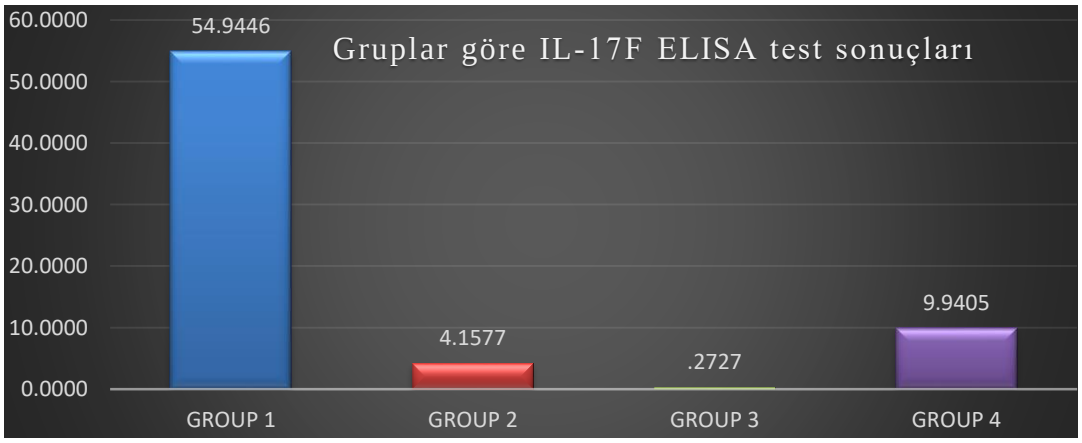
Şekil 4.4 TLR3 için ELISA analizinin sonuçları

4.6 ELISA ile IL-17F Analizinin Sonuçları

Şekil 4.5'te, ELISA ile IL-17F için serolojik testler, sağlıklı insanlar (grup-3) hariç tüm gruplar için IL-17F konsantrasyonlarında bir artış göstermektedir. Bu sonuç, Sousa için tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile benzerdir (Sousa *et al.* 2012). IL-17F testi için ELISA sonuçlarını RT.qPCR ile karşılaştırırsak, her iki testin de sağlıklı insanlara kıyasla yüksek sonuçlar verdiğini görmekteyiz. Bu teste; literatürde ve uygulamada en iyi, en doğru, en güvenilir ve en hassas test olarak kabul görmektedir (El Sanousi *et al.* 2016). IL-17F, HCV enfeksiyonunun önemli bir biyolojik belirteci olarak kabul edilmektedir (Wu *et al.* 2017).

Çizelge 4.6 IL-17F için tanımlayıcı istatistikleri

		Ortalama	Std. Sapma	Ortalama için %95 Güven Aralığı		Mini.	Maxi.
				Alt sınır	Üst Sınır		
IL-17F by ELISA	Grup 1	54,9446	10,87888	33,2820	76,6072	0,18	398,00
	Grup 2	4,1577	0,87396	2,4089	5,9064	0,01	17,90
	Grup 3	0,2726	0,03678	0,1983	0,3470	0,00	0,82
	Grup 4	9,9405	1,47668	6,8498	13,0312	0,05	16,10
	Toplam	23,9639	4,63820	14,8170	33,1108	0,00	398,00



Şekil 4.5 IL-17F için ELISA analizinin sonuçları

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı, böbrek yetmezliği olan bazı hastalarda hepatit C virüsünü moleküler olarak saptamak ve mikroRNA-135a, IL-17F ve TLR3 gibi bazı immünolojik belirteçlerle ilişkisini belirlemektir. Yapmiş olduğumuz bu çalışma ile, HCV enfeksiyonu ile miRNA 135a'nın gen ekspresyonu arasında bir ilişki tespit edilmiştir. Aynı zamanda elde ettiğimiz sonuçlar HCV enfeksiyonu ile IL-17F gen ekspresyonu arasında bir ilişki olduğunu ispat etmektedir. Bu bağlamda böbrek yetmezliğine sahip olan hastalar (diyaliz hastaları) ile IL-17F gen ekspresyonu arasında da bir ilişki bulunmuştur ve diyaliz hastalarında ve HCV'li kişilerde TLR3 konsantrasyonları yüksek değerler almıştır.

Tüm bu elde edilen veriler değerlendirildiğinde, çalışmamızda hepatit C virüsü ile enfekte hemodiyaliz hastaları için sadece microRNA 135a bakılmıştır bu nedenle araştırmacıların diğer HCV'si olmayan diyaliz hastaları ve sadece HCV'si olan diğer gruplar için microRNA 135a taraması yapmaları önerilmektedir. Ayrıca araştırmacılar microRNA 135a ve microRNA 146'yı ve bunların HCV ve HBV viral enfeksiyonu ile ilişkilerinin incelenmesi önemli sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır. HBV'nin DNA ve HCV'nin RNA olduğu bilinmektedir. Bu nedenle araştırmacılar tarafından, iki virüsün sırasıyla TLR3, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8 ve TLR9 ile ilişkisinin ve bunlar arasındaki etkileşimlerin ortaya konarak karşılaştırmaların yapılması bundan sonra yapılacak olan çalışmalar için tarafımızca önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Agnello, V., Ábel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. and Zhang, Q. X. 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96: 12766-12771.

Aida, I., Naglaa, A. E. A., Mamdouh, M., Amina, G., Soha, A. and Mohamed, Z. 2018. Evaluation of some available hcv antibody detection tests [elisa, chemiluminescence, immune assay] and rt-pcr assay in the diagnosis of hepatitis c virus infection.

Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Satio, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y. and Suzuki, T. 2008. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. Journal of virology, 82: 5715-5724.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-κB by Toll-like receptor 3. Nature, 413: 732-738.

Alter, H., Holland, P., Morrow, A., Purcell, R., Feinstone, S. and Moritsugu, Y. 1975. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. The Lancet, 306: 838-841.

Alter, M. J. 2011. HCV routes of transmission: what goes around comes around. In Seminars in liver disease, 31: 340-346.

Ardalan, M., Hejazian, S. M., Sharabiyani, H. F., Farnood, F., Aghdam, A. G., Bastami, M., Ahmadian, E., Vahed, S. Z. and Cucchiarini, M. 2020. Dysregulated levels of glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) and miR-135 in peripheral blood samples of cases with nephrotic syndrome. PeerJ, 8: e10377.

Barsoum, R. S., William, E. A. and Khalil, S. S. 2017. Hepatitis C and kidney disease: A narrative review. Journal of advanced research, 8, 113-130.

Bartel, D. P. 2018. Metazoan micrornas. Cell, 173: 20-51.

Benson, D. A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. and Sayers, E. W. 2015. GenBank. Nucleic acids research, 43(Database issue): D30.

Biswal, B. K., Cherney, M. M., Wang, M., Chan, L., Yannopoulos, C. G., Bilimoria, D., Nicolas, O., Bedard, J. and James, M. N. 2005. Crystal structures of the RNA-

dependent RNA polymerase genotype 2a of hepatitis C virus reveal two conformations and suggest mechanisms of inhibition by non-nucleoside inhibitors. Journal of Biological Chemistry, 280: 18202-18210.

Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. and Rouillé, Y. 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. Journal of virology, 80: 6964-6972.

Borgia, S. M., Hedskog, C., Parhy, B., Hyland, R. H., Stamm, L. M., Brainard, D. M., Subramanian, M. G., McHutchison, J. G., Mo, H., Svarovskaia, E. and Shafran, S. D. 2018. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. The Journal of infectious diseases, 218: 1722-1729.

Bowen, D. and Walker, C. 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. Nature, 436: 946-952.

Brass, V., Berke, J. M., Montserret, R., Blum, H. E., Penin, F. and Moradpour, D. 2008. Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105: 14545-14550.

Brinton, M. A., Gulyaeva, A. A., Balasuriya, U. B., Dunowska, M., Faaberg, K. S., Goldberg, T., Leung, F. C., Nauwynck, H. J., Snijder, E. J., Stadejek, T. and Gorbalenya, A. E. 2021. ICTV virus taxonomy profile: Arteriviridae 2021. The Journal of General Virology, 102: 45-52.

Brochado-Kith, Ó., Gómez Sanz, A., Real, L. M., Crespo García, J., Troya, J., Pineda, J. A., Arias Loste, M. T. and Fernández-Rodríguez, A. 2019. MicroRNA profile of HCV spontaneous clarified individuals, denotes previous HCV infection. Journal of clinical medicine, 8: 849-855.

Brooks, G. F., Butel, J. S. and Morse, S. A. C. 2001. Medical Microbiology. 22. Lange. Medical book. Me Graw: Hill. USA.

Burbelo, P. D., Dubovi, E. J., Simmonds, P., Medina, J. L., Henriquez, J. A., Mishra, N., Wagner, J., Tokarz, R., Cullen, J. M., Iadarola, M. J. and Kapoor, A. 2012. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. Journal of virology, 86: 6171-6178.

Chihiro, M., Stephen, J., Ranjit, R., Michael, C., Adrian, M., Peter, F., Herbert, L., Daniel, G., David, R., Alan, L., Margaret, J. and Koziel, L. 2006. Hepatitis C virus–specific immune responses and quasi-species variability at baseline are associated with nonresponse to antiviral therapy during advanced hepatitis C. Journal of Infectious Diseases, 193: 931-940.

Choe, J., Kelker, M. S. and Wilson, I. A. 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. Science, 309: 581-585.

Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. and Houghton, M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science, 244: 359-362.

Coller, K. E., Heaton, N. S., Berger, K. L., Cooper, J. D., Saunders, J. L. and Randall, G. 2012. Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. PLoS pathogens, 8: e1002466.

Crouchet, E., Baumert, T. F. and Schuster, C. 2017. Hepatitis C virus–apolipoprotein interactions: molecular mechanisms and clinical impact. Expert review of proteomics, 14: 593-606.

Davis, G. L., Albright, J. E., Cook, S. F. and Rosenberg, D. M. 2003. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. Liver Transplantation, 9: 331-338.

Ding, Q., Von Schaewen, M. and Ploss, A. 2014. The impact of hepatitis C virus entry on viral tropism. Cell host and microbe, 16: 562-568.

Dubuisson, J. and Cosset, F. L. 2014. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle–An update. Journal of hepatology, 61: 3-13.

Dubuisson, J., Penin, F. and Moradpour, D. 2002. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. Trends in cell biology, 12: 517-523.

Dunaeva, N. V. and Esaulenko, E. V. 2006. Structural and functional organization of hepatitis C virus genome. Vopr. Virusol, 51: 10-14.

Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. and Bienz, K. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. Journal of virology, 76: 5974-5984.

El Sanousi, S. M., Osman, Z. A., Mohamed, A., Al Awfi, M. S., Babair, Y. H. and Babair, M. H. 2016. Comparison of real-time PCR versus ELISA in the diagnosis of cytomegalovirus infection in pregnant women. Clin Microbiol Infect Dis, 1: 67-9.

El-Serag, H. B. 2012. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 142: 1264-1273.

El-Shimy, A., Ibrahim, H., Kamel, I., Shabaan, E. S. and Fouad, T. 2018. Value of toll-like receptor 3 (TLR3) in chronic kidney disease patients with hepatitis C virus infection. Journal of Medicine in Scientific Research: 1: 41-45.

Farrow, L. J., Stewart, J. S., Stern, H., Clifford, R. E., Smith, H. G. and Zuckerman, A. J. 1981. Non-A, non-B hepatitis in West London. The Lancet, 317: 982-984.

Foster , T. L., Thompson, G. S., Kalverda, A. P., Kankanala, J., Bentham, M., Wetherill, L. F., Thompson, J., Barker, A. A., Clarke, D., Noerenberg, M. and Griffin, S. 2014. Structure-guided design affirms inhibitors of hepatitis C virus p7 as a viable class of antivirals targeting virion release. Hepatology, 59: 408-422.

Fraser, C. S. and Doudna, J. A. 2007. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. Nature Reviews Microbiology, 5: 29-38.

Gacche, R. N. and Al-Mohani, S. K. 2012. Seroprevalence and risk factors for hepatitis C virus infection among general population in central region of Yemen. Hepatitis Research and Treatment, 23: 712-720.

Gawlik, K. and Gallay, P. A. 2014. HCV core protein and virus assembly: what we know without structures. Immunologic research, 60: 1-10.

Gehring, S., Gregory, S. H., Wintermeyer, P., Aloman, C. and Wands, J. R. 2009. Generation of immune responses against hepatitis C virus by dendritic cells containing NS5 protein-coated microparticles. Clinical and Vaccine Immunology, 16: 163-171.

Ghany, M. G., Strader, D. B., Thomas, D. L. and Seeff, L. B. 2009. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: an update. Hepatology, 49: 1335-1374.

Ginès, P. and Schrier, R. W. 2009. Renal failure in cirrhosis. New England Journal of Medicine, 361: 1279-1290.

Greenwood, D. C. 2007. Reliability of journal impact factor rankings. BMC medical research methodology, 7: 1-6.

Hassan, M. I., Mohamed, A., Hammad, K. M. and Selim, T. A. 2018. Evaluation of the Role of Irradiated, Culex pipiens, Mosquito (Diptera; Culicidae) in the Transmission of Hepatitis C Virus (HCV). Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology, 11: 139-148.

He, Y., Staschke, K. A. and Tan, S. L. 2006. HCV NS5A: a multifunctional regulator of cellular pathways and virus replication. Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology, 9: 65-69.

He, Y., Staschke, K. A. and Tan, S. L. 2006. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology, Chapter 9, Horizon Bioscience, Norfolk, UK.

Helle, F. and Dubuisson, J. 2008. Hepatitis C virus entry into host cells. Cellular and molecular life sciences, 65: 100-112.

Huret, J. L., Ahmad, M., Arsaban, M., Bernheim, A., Cigna, J., Desangles, F., Guignard, J. C., Jacquemot-Perbal, M. C., Labarussias, M., Leberre, V. and Dessen, P. 2012. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. Nucleic acids research, 41: 920-924.

Irshad, M., Ansari, M. A., Singh, A., Nag, P., Raghvendra, L., Singh, S. and Badhal, S. S. 2010. HCV-genotypes: a review on their origin, global status, assay system, pathogenecity and response to treatment. Hepato-gastroenterology, 57: 1529-1538.

Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H. and Iwakura, Y. 2009. Differential roles of interleukin-17A and-17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. Immunity, 30: 108-119.

Jin, W. and Dong, C. 2013. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. Emerging microbes and infections, 2: 1-5.

Kaito, M., Watanabe, S., Tanaka, H., Fujita, N., Konishi, M., Iwasa, M., Kobayashi, Y., Gabazza, E. C., Adachi, Y., Tsukiyama-Kohara, K. and Kohara, M. 2006. Morphological identification of hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins on the virion surface using immunogold electron microscopy. International journal of molecular medicine, 18: 673-678.

Kamal, S. M. 2008. Acute hepatitis C: a systematic review. Official journal of the American College of Gastroenterology, 103: 1283-1297.

Kamili, S., Drobeniuc, J., Araujo, A. and Hayden, T. 2012. Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection. Clin. Infect. Dis., 55: S43-S48.

Kao, J. H. and Chen, D. S. 2000. Transmission of hepatitis C virus in Asia: past and present perspectives. Journal of gastroenterology and hepatology, 15: 91-96.

Kapoor, A., Simmonds, P., Gerold, G., Qaisar, N., Jain, K., Henriquez, J. A., Firth, C., Hirschberg, D. L., Rice, C. M., Shield, S. and Lipkin, W. I. 2011. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108: 11608-11613.

Kato, N. 2000. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity and variation. Microbial and comparative genomics, 5: 129-151.

Kerr, J. R., Cunniffe, V. S., Kelleher, P., Coats, A. J. and Mattey, D. L. 2004. Circulating cytokines and chemokines in acute symptomatic parvovirus B19 infection: negative association between levels of pro-inflammatory cytokines and development of B19-associated arthritis. Journal of medical virology, 74: 147-155.

Kevin, D., Suresh, D., Ibrahim, M. and Craig, E. 2010. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. J. Biol. Chem., 285: 22725-22731.

Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G. D., Kosik, K. S., Church, G. M. and Ruvkun, G. 2004. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101: 360-365.

Kochlios, E., Foka, P. and Mavromara, P. 2012. Modulation of monocyte/macrophage-derived cytokine and chemokine expression profile by persistent Hepatitis C virus (HCV) infection leads to chronic inflammation. J. Mol. Biochem, 1: 40-53.

Kohaar, I., Ploss, A., Korol, E., Mu, K., Schoggins, J. W., O'Brien, T. R., Rice, C. M. and Prokunina-Olsson, L. 2010. Splicing diversity of the human OCLN gene and its biological significance for hepatitis C virus entry. Journal of virology, 84: 6987-6994.

Kong, L., Giang, E., Nieusma, T., Kadam, R. U., Cogburn, K. E., Hua, Y., Dai, X., Stanfield, R. L., Burton, D. R., Ward, A. B. and Law, M. 2013. Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. Science, 342: 1090-1094.

Lavie, M., Goffard, A. and Dubuisson, J. 2006. HCV glycoproteins: Assembly of a functional E1–E2 heterodimer. Hepatitis C viruses: Genomes and molecular biology, 34: 29-37.

Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., Pawlotsky, J. M. and Cosset, F. L. 2005. Human serum facilitates hepatitis C virus infection and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. Journal of virology, 79: 6023-6034.

Lee, D. S. and Chen, C. S. 2008. Development of a temperature sensor array chip and a chip-based real-time PCR machine for DNA amplification efficiency-based quantification. Biosens and Bioelectron, 23: 971-979.

Lee, S. R., Yearwood, G. D., Guillon, G. B., Kurtz, L. A., Fischl, M., Friel, T., Berne, CA., Kado, KW. and Kardos, K. W. 2010. Evaluation of a rapid, point-of-care test device for the diagnosis of hepatitis C infection. Journal of Clinical Virology, 48: 15-17.

Li, C., Barnes, E., Newton, P. N., Fu, Y., Vongsouvath, M., Klenerman, P., Okamoto, H., Abe, K., Pybus, O. G. and Lu, L. 2015. An expanded taxonomy of hepatitis C virus genotype 6: Characterization of 22 new full-length viral genomes. Virology, 476: 355-363.

Li, D., Huang, Z. and Zhong, J. 2015. Hepatitis C virus vaccine development: old challenges and new opportunities. National science review, 2: 285-295.

Li, K., Li, N. L., Wei, D., Pfeffer, S. R., Fan, M. and Pfeffer, L. M. 2012. Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in HCV-infected hepatocytes depends on TLR3 sensing of HCV dsRNA intermediates. Hepatology (Baltimore, Md.), 55: 666-673.

Li, Q., Lowey, B., Sodroski, C., Krishnamurthy, S., Alao, H., Cha, H., Chiu, S., El-Diwany, R., Ghany, M. G., Liang, T., J. and Liang, T. J. 2017. Cellular microRNA networks regulate host dependency of hepatitis C virus infection. Nature communications, 8: 1-16.

Lorenz, I. C. 2010. The hepatitis C virus nonstructural protein 2 (NS2): An up-and-coming antiviral drug target. Viruses, 2: 1635-1646.

Mahla, R. S., Reddy, C. M., Prasad, D. and Kumar, H. 2013. Sweeten PAMPs: role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology. Frontiers in immunology, 4: 248-253.

Mahmoud, S. M., Abass, Z. S. and Jafar, N. A. 2018. The use of Interleukin-10 as a biomarker for diagnosis of viral hepatitis type C Infections and related liver function in beta-thalassemic major patients. Journal of Madenat Alelem University College, 10: 10-25.

Mai, J., Virtue, A., Maley, E., Tran, T., Yin, Y., Meng, S., Pansuria, M., Jiang, X. and Yang, X. F. 2012. MicroRNAs and other mechanisms regulate interleukin-17 cytokines and receptors. Frontiers in bioscience, 4: 1478-1486.

Martin, D. A., Towne, J. E., Kricorian, G., Klekotka, P., Gudjonsson, J. E., Krueger, J. G. and Russell, C. B. 2013. The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: preclinical and clinical findings. Journal of Investigative Dermatology, 133: 17-26.

Meunier, J. C., Russell, R. S., Engle, R. E., Faulk, K. N., Purcell, R. H. and Emerson, S. U. 2008. Apolipoprotein c1 association with hepatitis C virus. Journal of virology, 82: 9647-9656.

Miró, J. M., Laguno, M., Moreno, A., Rimola, A. and Hospital Clinic Olt In Hiv Working Group. 2006. Management of end stage liver disease (ESLD): what is the current role of orthotopic liver transplantation (OLT)?. Journal of Hepatology, 44: 140-145.

Moradpour, D., Penin, F. and Rice, C. M. 2007. Replication of hepatitis C virus. Nature reviews microbiology, 5: 453-463.

Morales, J. M., Kamar, N. and Rostaing, L. 2012. Hepatitis C and renal disease: epidemiology, diagnosis, pathogenesis and therapy. Hepatitis C in Renal Disease, Hemodialysis and Transplantation, 176, 10-23.

Moreno-Moya, J. M., Vilella, F. and Simón, C. 2014. MicroRNA: key gene expression regulators. Fertility and sterility, 101: 1516-1523.

Morishima, C. and Gretch, D. R. 1999. Clinical use of hepatitis C virus tests for diagnosis and monitoring during therapy. Clinics in liver disease, 3: 717-740.

Nagel, R., le Sage, C., Diosdado, B., van der Waal, M., Vrielink, J. A. O., Bolijn, A., Meijer, G. A. and Agami, R. 2008. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. Cancer research, 68: 5795-5802.

Nelson, P. K., Mathers, B. M., Cowie, B., Hagan, H., Des Jarlais, D., Horyniak, D. and Degenhardt, L. 2011. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. The Lancet, 378: 571-583.

Niimoto, T., Nakasa, T., Ishikawa, M., Okuhara, A., Izumi, B., Deie, M., Suzuki, O., Adachi, N. and Ochi, M. 2010. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. BMC musculoskeletal disorders, 11: 1-11.

Nomura-Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Kitazawa, S., Ishido, S., Sada, K. and Hotta, H. 2006. Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. Journal of General Virology, 87: 1935-1945.

Obaid, F. H. 2014. Frequency of Hepatitis C Virus infection among blood donors in Al-Muthanna Province-Iraq. Ph.D Thesis. College of Science. Al-Muthanna University 112 pages, Iraq.

Ogden, S. C. and Tang, H. 2015. The missing pieces of the HCV entry puzzle. Future virology, 10: 415-428.

Op De Beeck, A. and Dubuisson, J. 2003. Hepatitis C virus envelope. Reviews in Medical Virology, 13: 233-241.

Park, H., Shin, S., Park, M. H., Kim, Y. S., Ahn, C., Ha, J. and Song, E. Y. 2014. Association of IL-17F gene polymorphisms with renal transplantation outcome. In Transplantation proceedings, 46(1): 121-123.

Pawlotsky, J. M. 2002. Molecular diagnosis of viral hepatitis. Gastroenterology, 122: 1554-1568.

Pawlotsky, J. M. 2004. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. Trends in microbiology, 12: 96-102.

Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D. and Pawlotsky, J. M. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. Hepatology, 39: 5-19.

Pybus, O. G., Markov, P. V., Wu, A. and Tatem, A. J. 2007. Investigating the endemic transmission of the hepatitis C virus. International journal for parasitology, 37: 839-849.

Qi, H., Chu, V., Wu, N. C., Chen, Z., Truong, S., Brar, G., Su, S. Y., Du, Y., Arumugaswami, V., Olson, C. A. and Sun, R. 2017. Systematic identification of anti-interferon function on hepatitis C virus genome reveals p7 as an immune evasion protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114: 2018-2023.

Quan, P. L., Firth, C., Conte, J. M., Williams, S. H., Zambrana-Torrelio, C. M., Anthony, S. J., Ellison, J. A., Gilbert, A. T., Kuzmin, I. V., Niezgoda, M. and Lipkin, W. I. 2013. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110: 8194-8199.

Racanelli, V. and Rehermann, B. 2003. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. Trends in immunology, 24: 456-464.

Ray, S. C., Thomas, D. L. and David, L. 2009. Chapter 154: Hepatitis C. Mandell, Gerald L., Bennett, John E., Dolin, Raphael. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone.

Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. and Bazan, J. F. 1998. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95: 588-593.

Ross, J., Irani, L., Silberman, M. S., Zaldivar, A. and Tomlinson, B. 2010. Who are the crowdworkers? Shifting demographics in Mechanical Turk. In CHI'10 extended abstracts on Human factors in computing systems, pp. 2863-2872.

Rouvier, E., Luciani, M. F., Mattei, M. G., Denizot, F. and Golstein, P. 1993. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences and homologous to a herpesvirus saimiri gene. The Journal of Immunology, 150: 5445-5456.

Rujuan Dai, S. 2014. Sexual dimorphism of miRNA expression: a new perspective in understanding the sex bias of autoimmune diseases. Therapeutics and clinical risk management, 10: 151-155.

Sarrazin, C., Gärtner, B. C., Sizmann, D., Babiel, R., Mihm, U., Hofmann, W. P., von Wagner, M. and Zeuzem, S. 2006. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. Journal of clinical microbiology, 44: 729-737.

Scheel, T. K. and Rice, C. M. 2013. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. Nature medicine, 19: 837-849.

Schregel, V., Jacobi, S., Penin, F. and Tautz, N. 2009. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106: 5342-5347.

Shabgah, A. G., Fattahi, E. and Shahneh, F. Z. 2014. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii, 31: 256-262.

Sharma, S. and Eghbali, M. 2014. Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. Biology of sex differences, 5: 1-8.

Shawa, I. T., Felmlee, D. J., Hegazy, D., Sheridan, D. A. and Cramp, M. E. 2017. Exploration of potential mechanisms of hepatitis C virus resistance in exposed uninfected intravenous drug users. Journal of viral hepatitis, 24: 1082-1088.

Shiffman, M. L. 2011. Chronic hepatitis c virus: Advances in treatment, promise for the future. Springer Science and Business Media, pp. 463, USA.

Smith, B. D., Teshale, E., Jewett, A., Weinbaum, C. M., Neaigus, A., Hagan, H., Jenness, S. M., Melville, S. K., Burt, R., Thiede, H. and DiNenno, E. A. 2011. Performance of premarket rapid hepatitis C virus antibody assays in 4 national human immunodeficiency virus behavioral surveillance system sites. Clinical Infectious Diseases, 53: 780-786.

Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T. and Simmonds, P. 2014. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. Hepatology, 59: 318-327.

Smith, K. D. 2009. Toll-like receptors in kidney disease. Current opinion in nephrology and hypertension, 18: 189-193.

Sodroski, C., Lowey, B., Hertz, L., Liang, T. J. and Li, Q. 2019. MicroRNA-135a modulates hepatitis C virus genome replication through downregulation of host antiviral factors. Virologica Sinica, 34: 197-210.

Soliman, H. A., Hozayen, W. G., Mahmoud, A. M., Abo-Seif, M. A. and Fayed, N. A. 2015. Significance of the hepatitis C virus core antigen testing as an alternative marker for hepatitis diagnosis in Egyptian patients. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 19: 2240-2245.

Sousa, G. M., Oliveira, I. S. andrade, L. J., Sousa-Atta, M. L. B., Paraná, R. and Atta, A. M. 2012. Serum levels of Th17 associated cytokines in chronic hepatitis C virus infection. Cytokine, 60, 138-142.

Strassl, R., Rutter, K., Stättermayer, A. F., Beinhardt, S., Kammer, M., Hofer, H., Ferenci, P. and Popow-Kraupp, T. 2015. Real-time PCR assays for the quantification of HCV RNA: concordance, discrepancies and implications for response guided therapy. PloS one, 10, e0135963.

Sułowicz, W., Radziszewski, A. and Chowaniec, E. 2007. Hepatitis C virus infection in dialysis patients. Hemodialysis International, 11: 286-295.

Swellam, M., Mahmoud, M. S. and Ali, A. A. F. 2011. Diagnosis of hepatitis C virus infection by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction: A comparative evaluation. IUBMB life, 63, 430-434.

Syed, G. H., Khan, M., Yang, S. and Siddiqui, A. 2017. Hepatitis C virus lipoviroparticles assemble in the endoplasmic reticulum (ER) and bud off from the ER to the Golgi compartment in COPII vesicles. Journal of virology, 91: e00499-17.

Tarish, H. R. and Ghanim, A. 2014. Al-Mola, Karar M. Abdulsada, Rafah Hady Lateef, Ghazi R Auda. Role of Culex mosquito in the transmission of hepatitis C virus: an experimental study in Iraq. American Journal of Research Communication, 2: 176-185.

Tarr, A. W., Urbanowicz, R. A. and Ball, J. K. 2012. The role of humoral innate immunity in hepatitis C virus infection. Viruses, 4: 1-27.

Tashkandy, M. A. A., Khodari, Y. A., Ibrahim, A. M., Dhafar, K. O., Gazzaz, Z. J. and Azab, B. A. 2007. Evaluation of the available anti-HCV antibody detection tests

and RT-PCR assay in the diagnosis of hepatitis C virus infection. Saudi journal of kidney diseases and transplantation, 18: 523-9.

Terrinoni, A., Calabrese, C., Basso, D., Aita, A., Caporali, S., Plebani, M. and Bernardini, S. 2019. The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 57: 932-953.

Ueta, M., Sotozono, C., Inatomi, T., Kojima, K., Tashiro, K., Hamuro, J. and Kinoshita, S. 2007. Toll-like receptor 3 gene polymorphisms in Japanese patients with Stevens–Johnson syndrome. British Journal of Ophthalmology, 91: 962-965.

Uliana, C. V., Riccardi, C. S. and Yamanaka, H. 2014. Diagnostic tests for hepatitis C: recent trends in electrochemical immunosensor and genosensor analysis. World Journal of Gastroenterology: WJG, 20: 15476.

Van Renne, N., Suarez, A. A. R., Duong, F. H., Gondeau, C., Calabrese, D., Fontaine, N., Ababsa, A., Bandiera, S., Croonenborghs, T., Pochet, N. and Lupberger, J. 2018. miR-135a-5p-mediated downregulation of protein tyrosine phosphatase receptor delta is a candidate driver of HCV-associated hepatocarcinogenesis. Gut, 67: 953-962.

Vieyres, G., Dubuisson, J. and Pietschmann, T. 2014. Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion. Viruses, 6: 1149-1187.

Wu, M. S., Wang, C. H., Tseng, F. C., Yang, H. J., Lo, Y. C., Kuo, Y. P., Tsai, D. J., Tsai, W. T. and Yu, G. Y. 2017. Interleukin-17F expression is elevated in hepatitis C patients with fibrosis and hepatocellular carcinoma. Infectious agents and cancer, 12: 1-6.

Xu, Z., Choi, J., Lu, W. and Ou, J. H. 2003. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. Journal of virology, 77: 1578-1583.

Yost, S. A., Wang, Y. and Marcotrigiano, J. 2018. Hepatitis C virus envelope glycoproteins: A balancing act of order and disorder. Frontiers in immunology, 9: 1917-1923.

Zhou, Y., Liu, J., Lei, Q., Han, H., Liu, W., Cunwei, T., Li, F. and Cao, D. 2020. Transcriptome Analysis of the Chicken Follicular Theca Cells with miR-135a-5p Suppressed. G3: Genes, Genomes, Genetics, 10: 4071-4081.

Zignego, A. L., Giannini, C. and Gragnani, L. 2012. HCV and lymphoproliferation. Clinical and Developmental Immunology, 20: 76-79.

EKLER

EK 1. ELISA

EK 2. Gerçek zamanlı PCR

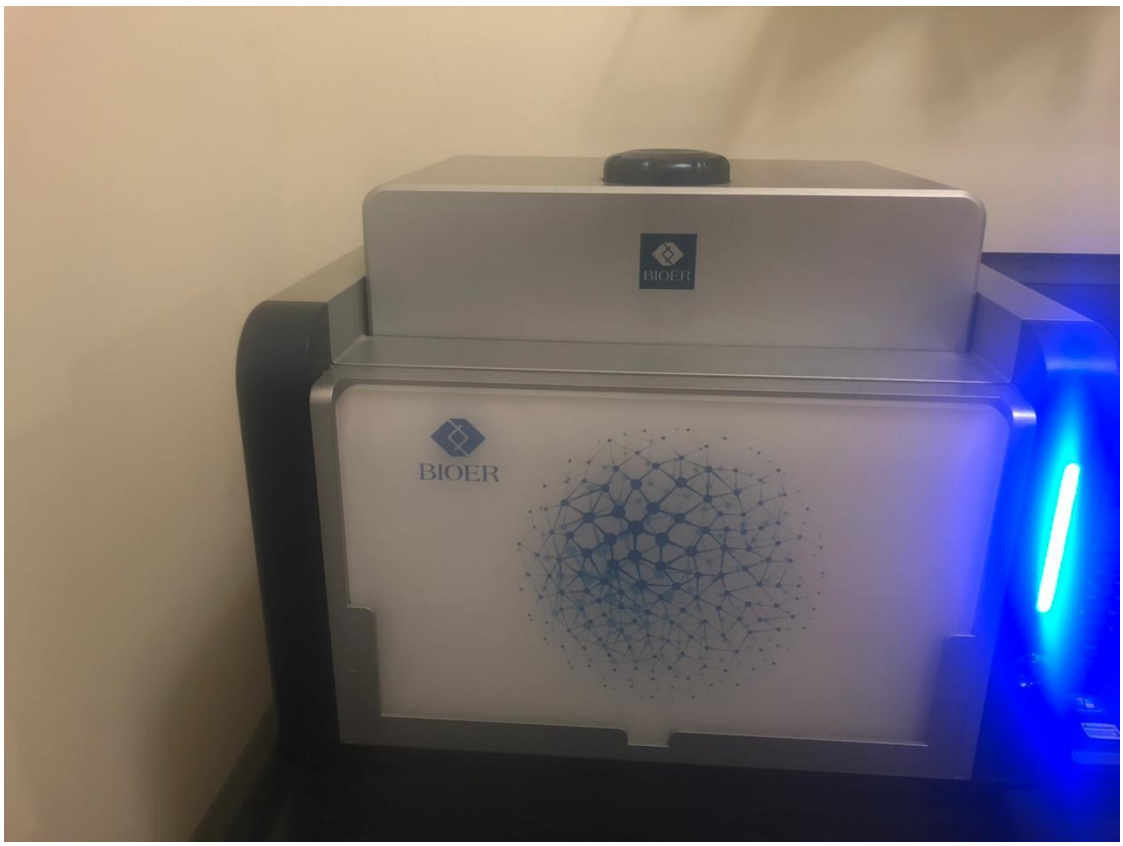
EK 3. Qubit 4

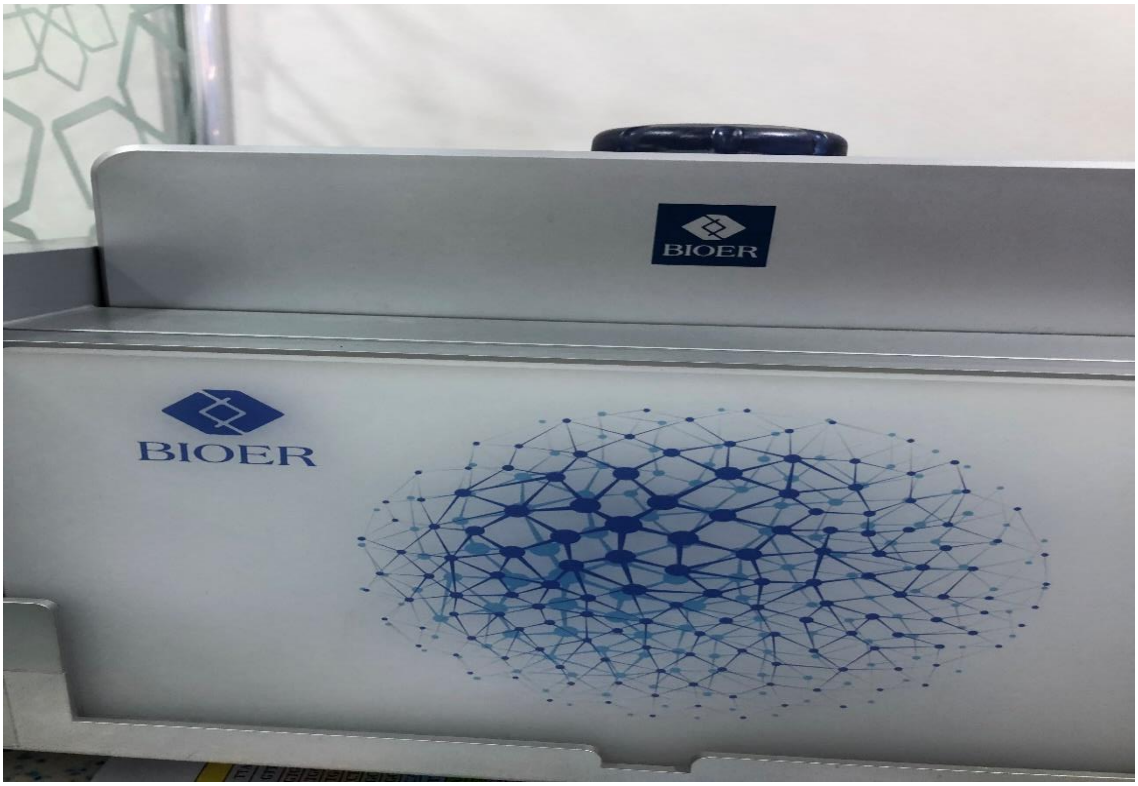
EK 4. RNA'dan cdNA'ya dönüştürücü sistem için SlimpliAmp thermal cycle

EK 1. ELISA

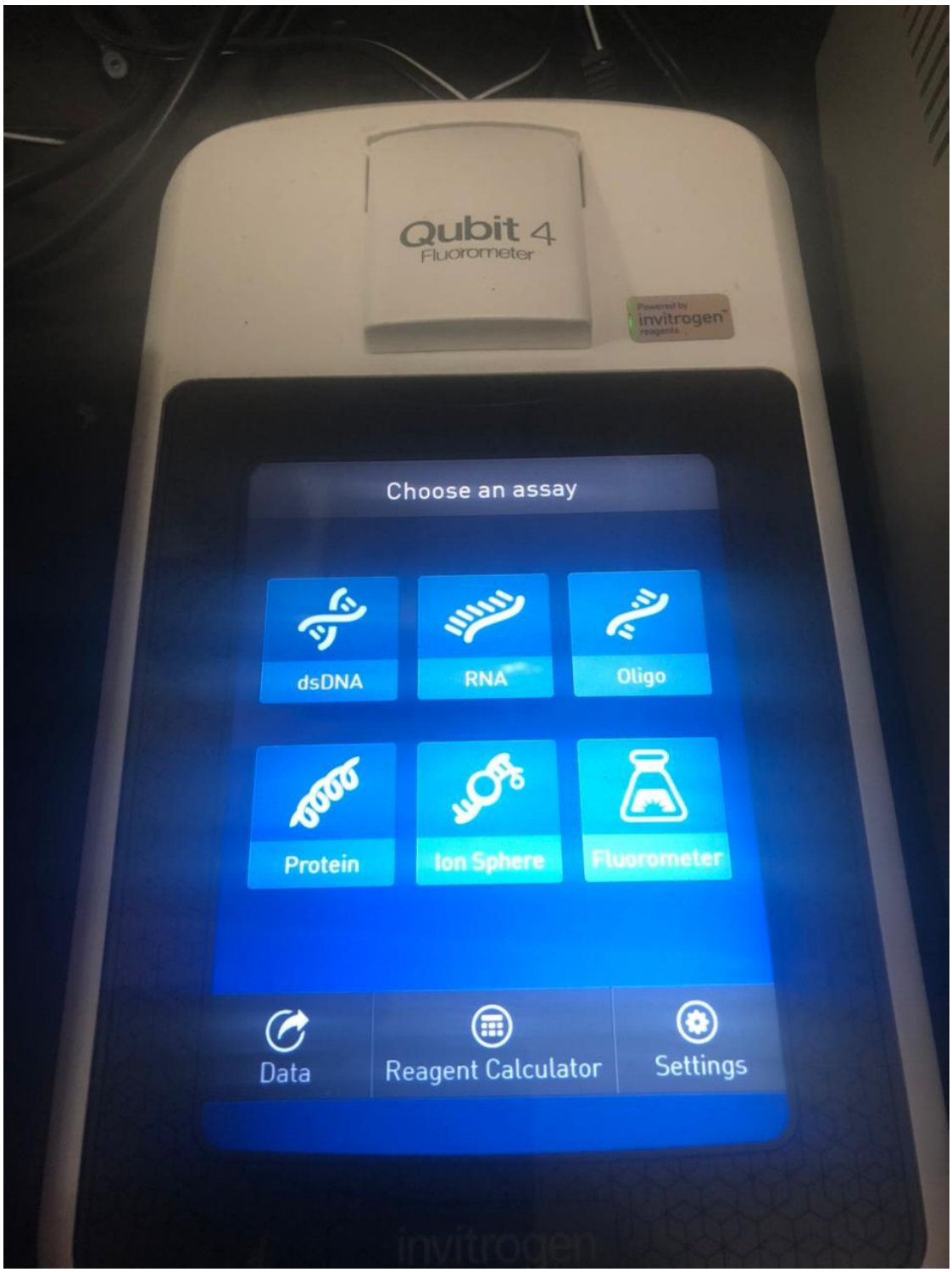

Foresight
EIA Test Kit
800 TS
microplate reader
BioTek
50 TS
microplate washer
BioTek

EK 2. Gerçek zamanlı PCR





EK 3. Qubit 4


Qubit 4
Fluorometer
Powered by
invitrogen
reagents
Choose an assay
dsDNA
RNA
Oligo
Protein
Ion Sphere
Fluorometer
Data
Reagent Calculator
Settings
invitrogen

EK 4. RNA'dan cdNA'ya dönüştürücü sistem için SlimpliAmp thermal cycle



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı	Wahbi Abdulrazzaq Sarhad SARHAD

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Anbar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	1991-1996

İş Deneyimi

Yıl	**Kurum**	**Görev**
1996-Halen	Ramadi Eğitim Hastanesi	Biyolog