Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2024;58(3):321-333*/doi: 10.5578/mb.202497188

Geliş Tarihi (Received): 13.11.2023 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.05.2024

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalarında hsa-miR-1908 ve hsa-miR-144 İfade Düzeylerinin Araştırılması

Investigation of hsa-miR-1908 and hsa-miR-144 Expression Levels in Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Patients

Özlem ALDEMİR[1](ID), Aynur ENGİN[2](ID), Burcu BAYYURT[3](ID), Serdal ARSLAN[4](ID)

[1] Sivas Numune Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Sivas.
[1] *Sivas Numune Hospital, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Sivas, Türkiye.*

[2] İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
[2] *İstanbul Yeni Yüzyıl University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, İstanbul, Türkiye.*

[3] Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Sivas.
[3] *Sivas Cumhuriyet University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Sivas, Türkiye.*

[4] Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.
[4] *Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Mersin, Türkiye.*

**Bu çalışma 8. TÜRKİYE EKMUD BİLİMSEL KONGRESİ (24-29 Kasım 2020, Antalya)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.*

***Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kurulu tarafından desteklenmiştir (Proje No: T-774).*

Makale Atıfı: *Aldemir Ö, Engin A, Bayyurt B, Arslan S. Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalarında hsa-miR-1908 ve hsa-miR-144 ifade düzeylerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2024;58(3):321-333.*

ÖZ

Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA), kene kaynaklı zoonotik viral bir hastalıktır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan mikroRNA (miRNA)'lar gelişme, farklılaşma, sağkalım, apoptoz ve yaşlanma gibi hücre yaşamı için gerekli olan birçok süreçte rol almaktadır. miRNA'lar işlevlerini yerine getiremedikleri takdirde viral enfeksiyonlar dahil birçok hastalığa yatkınlığa neden olurlar veya hastalığın ağır ya da hafif olmak üzere farklı klinik tablolarda geçirilmesine yol açarlar. Bu çalışmada, KKKA hastalarında hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 ifade düzeylerinin belirlenmesi ve farklı klinik KKKA tablolarında karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada 60 KKKA hastası ve 40 sağlıklı bireyden alınan kan örneklerinde hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 ifade düzeyleri kantitatif revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemiyle saptanmıştır. Ayrıca hastalığı şiddetli geçirenler ile şiddetli olmayanlar ya da ölen olgular ile yaşayan hastalar arasında, araştırılan miRNA ifade düzeylerinde herhangi bir fark olup olmadığı araştırılmıştır. RT-qPCR verileri "Veri Analiz Merkezi"ne (Qiagen, Almanya) yüklenmiş ve ΔΔCq (ΔΔCt) yöntemi kullanılarak analiz yapılmıştır. p değeri, çalışma gruplarındaki genler için Student's t testine göre hesaplanmıştır. KKKA hastalarında kontrol grubuna göre hsa-miR-144 ifade düzeyinin azaldığı (kat değişimi= 0.09) ve hsa-miR-1908 ifade düzeyinin 1.44 kat arttığı belirlenmiştir. Hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908'in ifadesinin, şiddetli olmayan hastalara kıyasla şiddetli hastalarda sırasıyla 2 ve 2.36 kat arttığı bulunmuştur. hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908'in ifade düzeyleri hayatta kalan hastalarla karşılaştırıldığında ölen olgularda sırasıyla 16.3 ve 14.3 kat yüksek olup bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ek olarak, düşük lökosit sayısı olan hastaların hsa-miR-144 ifade düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış ve hsa-miR-1908 ifade düzeyi, protrombin zamanı

İletişim (Correspondence): *Uzm. Dr. Özlem Aldemir, Sivas Numune Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Sivas, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+90 (506) 258 8655,* ***E-posta (E-mail):*** *ozlem_gulgec@hotmail.com*

(PT) uzamış hastalarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Bu çalışma literatürde KKKA hastalarında hsa-miR-1908 ifade düzeyini araştıran ilk çalışmadır. Sonuç olarak, bu çalışmanın verileri hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908'in, KKKA hastalığının prognoz ve klinik seyrinin öngörülmesinde önemli bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: *Kırım-Kongo kanamalı ateşi; hsa-miR-144; hsa-miR-1908; gen ifadesi.*

ABSTRACT

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a tick-borne zoonotic viral disease. MicroRNAs (miRNAs), which play an important role in the regulation of gene expression, are involved in many processes essential for cell life such as development, differentiation, survival, apoptosis and aging. If miRNAs fail to fulfill their functions, they cause susceptibility to many diseases, including viral infections or cause the disease to be experienced in different clinical situations, such as severe or mild. In this study, we aimed to determine the expression levels of hsa-miR-144 and hsa-miR-1908 in CCHF patients and to compare the results in different clinical courses of CCHF disease. In this study, expression levels of hsa-miR-144 and hsa-miR-1908 were detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) in blood samples obtained from 60 CCHF patients and 40 healthy individuals. We also investigated the differences in the expression levels of the microRNAs between patients with severe and non-severe disease or between patients who died and survived. Quantitative polymerase chain reaction data were uploaded to the "Data Analysis Center" (Qiagen, Germany) and analyzed using the ΔΔCq (ΔΔCt) method. p value was calculated according to Student's t test for genes in the study groups. The expression level of hsa-miR-144 decreased (fold change= 0.09) and the expression level of hsa-miR-1908 increased 1.44-fold in CCHF patients compared to the control group. The expression of hsa-miR-144 and hsa-miR-1908 increased 2 and 2.36-fold, respectively, in severe patients compared to non-severe patients. The expression levels of hsa-miR-144 and hsa-miR-1908 were 16.3- and 14.3-fold higher, respectively, in fatal cases compared to surviving patients and these results were statistically significant. In addition, the expression level of hsa-miR-144 was significantly decreased in patients with low leukocyte counts and the expression level of hsa-miR-1908 was significantly increased in patients with prolonged prothrombin time (PT). This is the first study in the literature investigating the expression level of hsa-miR-1908 in CCHF patients. In conclusion, the data of this study suggest that hsa-miR-144 and hsa-miR-1908 may be important biomarkers in predicting the prognosis and clinical course of CCHF disease.

Keywords: *Crimean-Congo hemorrhagic fever; hsa-miR-144; hsa-miR-1908; gene expression.*

GİRİŞ

Kırım-Kongo kanamalı ateş virüsü (KKKAV) *Nairoviridae* ailesinin *Orthonairovirus haemorrhagiae* genusunda sınıflandırılan, kene kaynaklı bir RNA virüsüdür[1]. Bu virüsün neden olduğu Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) Afrika, Orta Doğu, Asya ve Güneydoğu Avrupa'nın bazı bölgelerinde endemik olarak görülen bir hastalıktır[2]. Mikrovasküler hasar ve hemostaz bozukluğuyla ortaya çıkan endotel hücre disfonksiyonu ve bozulmuş immün yanıt, KKKA hastalığının seyrinde önemli rol oynar[3-7]. Hastalık özellikle ateş, kanama ve karaciğer fonksiyon bozukluğuyla seyreder. Enfekte bireylerde farklı klinik tablolar görülebilmektedir[8]. Bazı hastalar asemptomatik iken bazıları ölümcül seyretmektedir. Klinik seyirdeki bu farklılığın nedeni tam olarak bilinmemektedir.

MikroRNA (miRNA)'lar, posttranskripsiyonel gen regülasyonunda önemli rol oynayan ve yüksek oranda korunan küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır. Hedef messenger RNA (mRNA)'larının tipik olarak 3' UTR'leri içinde tamamlayıcı sekanslara bağlanarak translasyonu baskılar veya mRNA degradasyonunu indükler[9]. miRNA'ların gelişme, farklılaşma,

sağkalım, apoptoz ve yaşlanma gibi hücre yaşamı için gerekli birçok süreçte görev aldığı, işlevlerini yerine getiremediklerinde kanser başta olmak üzere birçok hastalığa yatkınlığa yol açtığı bildirilmiştir. miRNA'lar, doğal ve kazanılmış immün yanıtta da önemlidir[10]. Literatürde miRNA'ların viral replikasyonda, enfekte hücrelerin çoğalmasında, bağışık yanıtta ve inflamasyonda önemli rol oynadığını bildiren çok sayıda çalışma vardır[11-13]. Örneğin hsa-miR-144'ün, şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)] kaynaklı koronavirüs hastalığı 2019 [coronavirus disease 2019 (COVID-19)] hastalarında, gönüllülere göre daha düşük seviyelerde ifade edildiği ve potansiyel bir tanı biyobelirteci olabileceği bildirilmiştir[13]. Yapılan çalışmalar, enfeksiyon hastalıklarında miRNA'ların patogenezde rol oynayabileceğini ya da ifade düzeylerinin prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

KKKA hastalığı ile benzer özellikler gösteren çeşitli viral enfeksiyonlarda hsa-miR-1908'in çalışılmış olması ve bazılarında hastalığın seyri ile ilişkili bulunması, hsa-miR-1908'i bu çalışmaya dahil etme sebeplerimizden biridir[11]. Kohno ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada[11], hepatit B virüs enfeksiyonunda aralarında hsa-miR-1908'inde bulunduğu dört miRNA'nın, fare ve insan karaciğerinde miktar olarak arttığı bulunmuştur. Bahsedilen çalışmada yazarlar, çalıştıkları miRNA ifade düzeylerinin immün yanıtla ilişkili olduğunu bildirmiştir. KKKA hastalığında da karaciğer etkilenmektedir. Özellikle ciddi seyirli vakalarda karaciğer hasarı daha fazladır. KKKA hastalarında hsa-miR-1908'in hastalığın seyrinde etkili olması mümkündür.

Virüslerin neden olduğu enfeksiyonlarda, konağın immün yanıtında TNF alfa, interferon ve NF-kappaB önemlidir. Bu durum KKKA hastalığı için de geçerlidir. Literatürde, TNF alfa ve NF-kappaB ile hsa-miR-1908'in ilişkisini gösteren çalışmalar bulunmaktadır[11,14]. KKKA hastalarında, yüksek serum TNF-alfa düzeyinin, hastalığın ciddi seyriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir[15,16]. Kuang ve arkadaşları[14], hsa-miR-1908 ile TNF-alfa arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada, TNF-alfa'nın preadipositlerdeki hsa-miR-1908 ifadesini sınırladığı bildirilmiştir.

Viral enfeksiyona yanıtta interferon önemlidir. İnterferon salınmasında rol alan NF-kappaB'nın, hsa-miR-1908 promotörü üzerinde bağlanma yerleri olduğu gösterilmiştir[14].

KKKA hastalarında kandaki ifade düzeyini incelediğimiz bir diğer miRNA ise hsa-miR-144'tür. Literatürde, hsa-miR-144 ile bakteriyel ya da viral enfeksiyonların ilişkisi pek çok çalışmada irdelenmiştir[10,13,17,18]. Oysa KKKA hastalarında hsa-miR-144 ifade düzeyinin hastalığın seyri ile ilişkisi araştırılmamıştır. Bu nedenle KKKA hastalarında yaptığımız bu çalışmaya, enfeksiyonlardaki önemi bildirilen hsa-miR-144 de dahil edilmiştir.

Bu çalışmada, hastalar ile kontrol grubu arasında miRNA'ların ifade düzeyleri değerlendirilmiş, ek olarak hastalarda çeşitli laboratuvar test sonuçlarına göre hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 gen ifade düzeyleri karşılaştırılmıştır. Çalışma KKKA hastalarında hsa-miR-1908 ifade düzeylerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bu çalışmada, KKKA hastalarında saptanan hsa-miR-1908 ve hsa-miR-144 ifade düzeylerinin belirlenmesi, klinik şiddet

durumuna göre hastalığı şiddetli geçirenler ile geçirmeyenler ayrıca ölen olgular ile yaşayanlar ve ölen olgular ile kontrol grubu arasında karşılaştırma yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 19.04.2017 ve Karar No: 2017-04/03). Tüm hasta ve gönüllülerden bilgilendirilmiş onam alındı.

Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Bu çalışmada 60'ı hasta, 40'ı kontrol grubu olmak üzere toplam 100 kan örneği kullanıldı [kan örnekleri için α= 0.05; β= 0,20; (1-β)= 0.80 ve R= 1.3 alınarak, hasta grubuna 60, kontrol grubuna ise 40 kişinin dahil edilmesine karar verildi ve testin gücü p= 0.80634 olarak bulundu]. Çalışma gruplarının tamamı yetişkinlerden (> 18 yaş) oluşmaktaydı. Serviste yatırılarak takip edilen KKKA tanılı hastalar çalışmaya alındı. KKKA tanısı, hasta kan örneklerinde KKKAV için pozitif saptanan kantitatif PCR (viral RNA'nın belirlenmesi) ile ve/veya enzim bağlantılı immünosorbent testi [enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)] ile KKKAV'ye spesifik IgM antikorlarının saptanmasıyla konuldu. Yaş ve cinsiyet açısından hasta grubuyla benzer olan ve bilinen herhangi bir hastalığı olmayan, sağlıklı gönüllü bireyler kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Hastalar, Bakır ve arkadaşlarının tanımladığı[19] Tablo I'de belirtilen kriterlere göre klinik ciddiyet açısından şiddetli ve şiddetli olmayan olarak gruplandırıldı. Orta şiddette hasta sayısının az olması nedeniyle bu gruptaki hastalar şiddetli hasta grubuna dahil edildi. Şiddet derecelendirme sistemi [severity grading score system (SGS)] puanı 6-15 olan hastalar şiddetli, SGS puanı ≤ 5 olan hastalar ise şiddetli olmayan hastalar olarak kabul edildi. Hasta ve kontrol gruplarından alınan kanlar, RNA stabilizasyon solüsyonu (tetradesil trimetilamonyum oksalat ve tartarik asit) içeren tüplere (PAXgene Blood RNA tubes, Qiagen, Almanya) konularak çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı.

RNA Ekstraksiyonu ve RT-qPCR

miRNA içeren toplam RNA, kit protokolüne göre miRNeasy mini kiti (Qiagen-katalog no: 217004-Almanya) kullanılarak kan örneklerinden izole edildi. Tamamlayıcı DNA (cDNA), RNA'ların revers transkripsiyonu için miScript II RT Kiti (Qiagen-katalog no: 218161-Almanya) kullanılarak elde edildi. Hasta ve kontrol kanında hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 ifade seviyelerinin belirlenmesi amacıyla cDNA sentezi aşamasından sonra RT-qPCR aşamasına geçildi. RT-qPCR, örnekteki nükleik asit miktarının belirlenmesinde kullanılan bir yöntem olup bu yöntemde amplifikasyonu görünür hale getiren floresan işaretli prob ya da boyalar kullanılır. Bu çalışmada SYBR Green boyası kullanıldı. Bu çalışma için hsa-miR-144 hsa-miR-1908'in optimize edilmiş Qiagen doğrulanmış primerleri (miScript primer assay) ve miScript SYBR Green PCR Kiti (Qiagen-218073-Almanya) ve referans geni RNU6 (Qiagen-miScript primer assay) kullanılarak RT-qPCR adımı gerçekleştirildi. RT-qPCR deneylerinde her bir tüpe eklenen nükleik asit miktarı µL'de 100 ng'dır. Her hasta/kontrol için RT-qPCR deneyleri üç kez tekrar edildi ve ortalama Ct değerleri alınarak istatistiksel analiz gerçekleştirildi.

Tablo I. Şiddet Derecelendirme Sistemi

Parametre	Puan
Aspartat transaminaz değeri	
< 5 × NDÜS	0
≥ 5 × NDÜS	1
Alanin transaminaz değeri	
<NDÜS	0
≥NDÜS	1
Laktat dehidrogenaz değeri	
< 3 × NDÜS	0
≥ 3 × NDÜS	1
Beyaz küre sayısı	
< 10000 h/µL	0
≥ 10000 h/µL	1
Hepatomegali	
Yok	0
Var	1
Organ yetersizliği	
Yok	0
Var	1
Kanama	
Yok	0
Var	1
Yaş	
< 60	0
≥ 60	1
Trombosit sayısı	
≥ 100000 h/µL	0
≥ 50000, < 100000 h/µL	1
< 50000 h/µL	2
PT'de uzama	
< 3 saniye	0
≥ 3 saniye, < 6 saniye	1
≥ 6 saniye	2
aPTT	
< 70	0
≥ 70	1
INR	
< 1.6	0
≥ 1.6	1

NDÜS: Normal değerin üst sınırı, PT: Protrombin zamanı, aPTT: Aktive edilmiş kısmi tromboplastin zamanı, INR: Uluslararası normalleştirilmiş oran.

İstatistiksel Analiz

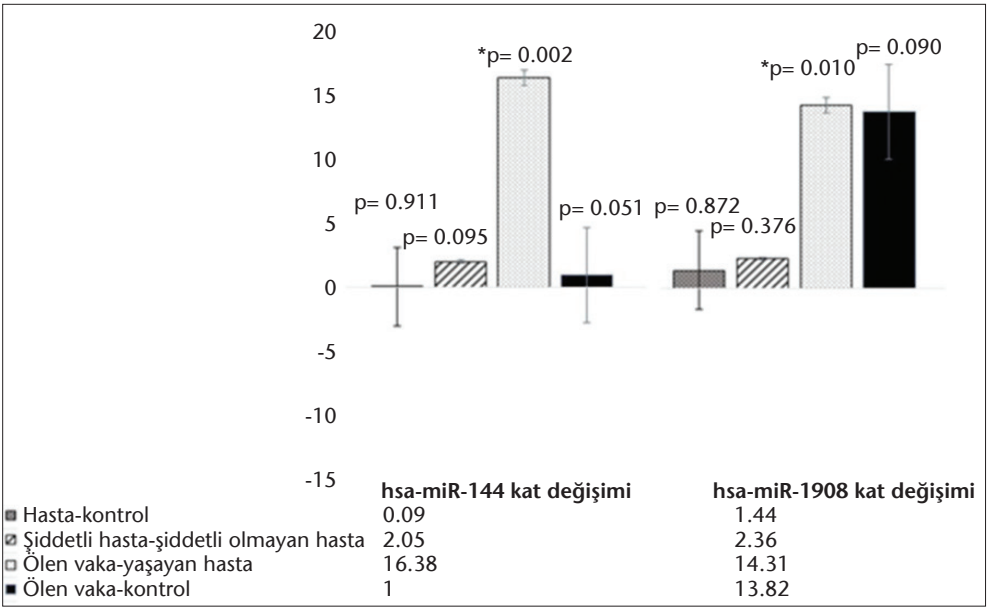
Hasta ve sağlıklı kişilerden elde edilen RT-qPCR verileri Qiagen'in "Veri Analiz Merkezi"ne (https://www.qiagen.com/de/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/) yüklendi ve analiz ΔΔCq yöntemi kullanılarak yapıldı. P değeri, çalışma gruplarındaki genler için Student's t testi temel alınarak hesaplandı. Veri analizi için ΔΔCq (ΔΔCt) yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, reaksiyonlarda her numunedeki referans gen ve ilgilenilen genler için Cq değeri belirlendi. Her örnek için ilgilenilen her genin Cq değerleri ile referans genin Cq değeri arasındaki fark (ΔCq) hesaplandı. Karşılaştırılacak örneklerin ilgilenilen genler için ΔCq değerlerinin farkı (ΔΔCq) saptandı. Gen ifadesindeki kat değişikliği $2^{-\Delta\Delta Cq}$'ya eşit olarak belirlendi. Parametrik test varsayımlarının karşılanamadığı durumlarda Mann-Whitney U testi kullanıldı. 0.05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hasta grubuna 35 (%58.33) erkek, 25 (%41.67) kadın hasta dahil edilmiştir. Altmış hasta bireyin 25 (%41.67)'i şiddetli hastalardan; 35 (%58.33)'i ise şiddetli olmayan hastalardan oluşmuştur. KKKA hastalarının 11 (%18.33)'i ölümcül seyretmiştir. Sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubunda 25 (%62.5) erkek, 15 (%37.5) kadın birey yer almıştır. Hasta grubunun yaş ortalaması 48.38 yıl iken, kontrol grubunun yaş ortalaması 44.45 yıl olarak belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında yaş (p= 0.23) ve cinsiyet (p= 0.68) açısından istatistiksel olarak fark saptanmamıştır.

Bu çalışmada ilk olarak hasta ve kontrol grubunda saptanan hsa-miR-1908 ve hsa-miR-144 ifade düzeyleri karşılaştırılmıştır. Ardından saptanan hsa-miR-1908 ve hsa-miR-144 ifade düzeyleri, KKKA hastalığı şiddetli/şiddetli olmayan ayrıca ölen vaka ve yaşayan hastalarda kıyaslanmıştır. Ölen olgular kontrol grubuyla her iki miRNA ifade düzeyi açısından karşılaştırılmıştır. Öte yandan bu çalışmada hasta grubundaki bireyler, beyaz kan hücresi [white blood cell (WBC)], alanin aminotransferaz (ALT), protrombin zamanı [protrombin time (PT)] ve trombosit sayısı [platelet (PLT)] düzeyleri gibi bazı laboratuvar test sonuçları açısından, normal değerler arasında olanlar ile normal değer aralığında olmayanlar (yüksek ya da düşük) şeklinde iki gruba ayrılmıştır. Bu iki grup hsa-miR-1908 ve hsa-miR-144 ifade düzeyleri açısından karşılaştırılmıştır.

ΔΔCq analiz sonucuna göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, KKKA hastalarındaki hsa-miR-144 ifadesinin 11 kat azaldığı (p= 0.91), hsa-miR-1908 ifadesinin ise 1.44 kat (p= 0.87) artmış olduğu tespit edilmiştir. Şiddetli olmayan hastalarla karşılaştırıldığında şiddetli hastalarda hsa-miR-144 ifadesi 2.05 kat (p= 0.09) artarken, hsa-miR-1908 ifadesi ise 2.36 kat (p= 0.37) artmıştır. Ölen vakalarda hayatta kalanlara kıyasla, hsa-miR-144'ün ifade düzeyi 16.3 kat artmışken (p= 0.002), hsa-miR-1908'in ifade düzeyi 14.3 kat artmış olarak saptanmıştır (p= 0.01). Bu iki düzeydeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ölen olgular ile kontrol grubu kıyaslandığında, hsa-miR-144 kat değişimi 1.00 olarak hesaplanmıştır (p= 0.051) ve hsa-miR-1908 seviyesi 13.8 kat artmıştır (p= 0.09) (Şekil 1).



Şekil 1. *Gruplara ait hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 gen ekspresyon (ifade) verileri ve hata barları.*

Hasta ile kontrol grubu, şiddetli/şiddetli olmayan hasta, ölen vakalar ile yaşayan hasta ve ölen vaka ile kontrol grubu kıyaslandığında saptadığımız hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 ifade düzeyleri Tablo II'de sunulmuştur.

Bu çalışmada, KKKA hastalarında ağır klinik tablo ile ilişkili olduğu bilinen bazı laboratuvar test sonuçları ile hasta gruplarındaki miRNA ifadelenme düzeyleri ilişkisi araştırılmıştır. WBC değeri normal değerin altında (< $4.0x10^3$/uL) olanlarda yani lökopenik hastada

Tablo II. *Hasta ve Kontrol Grubunda hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması*

Grup	Gen	Kat Değişimi[a]	Kat Regülasyonu[b]	p
Hasta-kontrol	hsa-miR-144	0.09	-11.11	0.911
	hsa-miR-1908	1.44	1.44	0.872
Şiddetli/Şiddetli olmayan hasta	hsa-miR-144	2.05	2.05	0.095
	hsa-miR-1908	2.36	2.36	0.376
Ölen vaka-yaşayan hasta	hsa-miR-144	16.38	16.38	0.002*
	hsa-miR-1908	14.31	14.31	0.010*
Ölen vaka-kontrol	hsa-miR-144	1.00	1.00	0.051
	hsa-miR-1908	13.82	13.82	0.090

[a]Kat değişimi: Karşılaştırılan gruplar arasındaki kat değişimi, p*< 0.05 değeri farklılık açısından önemli kabul edilmiştir.

[b]Kat regülasyonu: Kat düzenlemesini ifade eder. Kat düzenlemesi, kat değişikliği sonuçlarını biyolojik olarak anlamlı bir şekilde temsil eder. Gruplar karşılaştırıldığında 1'den büyük kat değişimi değerleri pozitif veya yukarı düzenlemeyi (gen ifadesinin arttığını) belirtir ve kat düzenlemesi, kat değişimine eşittir. Kat değişim değerleri 1'den küçükse negatif veya aşağı düzenlemeyi (gen ifadesinin azaldığını) belirtir ve kat düzenlemesi 1/kat değişimine eşittir (https://www.phalanx.com.tw/wp-content/uploads/2019/05/qPCR-array_Report.pdf).

Tablo III. *Laboratuvar Test Sonuçları Normal Sınırda Olanlar ile Olmayan Hastalarda, hsa-miR-144 ve has-miR-1908 İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması*

Parametre	Gen	Kat Değişimi[a]	Kat Regülasyonu[b]	p
Lökosit sayısı[c]	hsa-miR-144	0.29	-3.40	0.038*
	hsa-miR-1908	0.76	-1.30	0.392
Alanin aminotransferaz[d]	hsa-miR-144	1.58	1.58	0.438
	hsa-miR-1908	2.64	2.64	0.324
Protrombin zamanı[e]	hsa-miR-144	4.67	4.67	0.076
	hsa-miR-1908	7.28	7.28	<0.01*
Platelet sayısı[f]	hsa-miR-144	5.12	5.12	-
	hsa-miR-1908	2.37	2.37	-

[a]Kat değişimi: Karşılaştırılan gruplar arasındaki kat değişimi, [c]Lökosit sayısı düşük olanlarla normal aralıkta olanlar karşılaştırıldı, [d]Alanin aminotransferaz değeri normal olanlarla yüksek saptananlar karşılaştırıldı, [e]Protrombin zamanı normal olanlarla uzamış olanlar karşılaştırıldı; [f]Platelet sayısı normal olanlarla düşük olan hastalar karşılaştırıldı, p*< 0.05 değeri istatistiksel farklılık açısından önemli kabul edildi.

[b]Kat regülasyonu: Kat düzenlemesini ifader eder. Kat düzenlemesi, kat değişikliği sonuçlarını biyolojik olarak anlamlı bir şekilde temsil eder. Gruplar karşılaştırıldığında 1'den büyük kat değişimi değerleri pozitif veya yukarı düzenlemeyi (gen ifadesinin arttığını) belirtir ve kat düzenlemesi, kat değişimine eşittir. Kat değişim değerleri 1'den küçükse negatif veya aşağı düzenlemeyi (gen ifadesinin azaldığını) belirtir ve kat düzenlemesi 1/kat değişimine eşittir (https://www.phalanx.com.tw/wp-content/uploads/2019/05/qPCR-array_Report.pdf).

hsa-miR-144 ifade düzeylerinin, lökosit sayısı normal aralıktaki hastalara kıyasla yaklaşık üç kat azalmış (p= 0.038) olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada WBC'si normal değerin üzerinde (> $10.6x10^3$/uL) saptanan herhangi bir hasta gözlenmemiştir. PT değeri normal değerin üzerinde (normal aralık= 8.4-12 saniye) olanlarda yani PT'si uzayan hastalarda hsa-miR-1908 değerinin, PT değeri normal saptanan hastalara kıyasla yaklaşık yedi kat artmış (p< 0.01) olduğu görülmüştür. ALT değeri normal değerin üzerinde olanlarda, normal aralıkta (normal aralık= 0-50 U/L) bulunan hastalara kıyasla, hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 ifade düzeyleri sırasıyla 1.58 (p= 0.438) ve 2.64 (p= 0.324) kat artış saptanmıştır. Bu çalışmada platelet sayısı sadece iki hastada normal sınırlar içinde tespit edilmiştir. Diğer tüm hastalarda platelet sayısı düşük bulunmuştur (< 150). Bu nedenle platelet değeri açısından normal hastalarla düşük saptanan hastalar arasında p değeri hesaplanamamıştır. Hasta grubunda saptanan laboratuvar test sonuçları ile hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 ifade düzeylerinin karşılaştırılma sonuçları Tablo III'te sunulmuştur.

TARTIŞMA

KKKA hastalığı dünya genelinde giderek önemi artan, kene kaynaklı viral bir hastalıktır. Bazı hastalarda asemptomatik seyrederken, diğerlerinde ölümcül olabilmektedir. Klinik seyirdeki bu farklılığın nedeni tam olarak bilinmemektedir. Klinik tablodaki bu değişikliğin birçok viral enfeksiyonun patogenezinde rol oynayan epigenetik farklılıklar nedeniyle olabileceği öne sürülmüştür[20]. Viral enfeksiyonlarda, virüsün konak bağışıklık sisteminden kaçması için çeşitli konak miRNA'ları artma ya da azalma şeklinde düzenleyebildiği, bazı miRNA'ların ise antiviral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir[21]. Bu çalışmada viral bir enfeksiyon olan KKKA hastalarında hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 ifade seviyeleri araştırılmış olup, KKKA hastalarında kontrol grubuna göre hsa-miR-144 ifade düzeyinin

azaldığı, hsa-miR-1908 ifadesinin artmış olduğu saptanmıştır. Ayrıca, hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 ifade düzeylerinin klinik seyri şiddetli olanlarda, şiddetli olmayanlara göre arttığı görülmüştür. Ölen vakalarda hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 ifade düzeyi, hayatta kalan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 1).

Yapılan literatür araştırmasında, KKKA hastalığı ile benzer özellikleri olan çeşitli viral hastalıklarda, hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908'i, özellikle immün yanıtla ilişkilendiren çalışmalar olduğu görülmüştür. Bu nedenle ele alınan hastalarda hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908'in araştırılması planlanmıştır[10,11,13,14,17,18].

Swanepoel ve arkadaşları[22], KKKA hastalığının ilk beş günü içinde hasta kanlarında ölçülen WBC, PLT, aspartat aminotransferaz (AST), ALT, aktive parsiyel tromboplastin zamanı [activated partial thromboplastin time (aPTT)] ve fibrinojen düzeylerinin mortaliteyi öngörmede önemli laboratuvar parametreleri olduğunu bildirmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada hastaların WBC, PLT, ALT ve PT laboratuvar testlerinin sonuçları ile incelenen mikroRNA'ların ifade düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığı da incelenmiştir. PT'si uzayan hastalarda hsa-miR-1908 değerinin, PT değeri normal saptanan hastalara kıyasla yaklaşık yedi kat ($p< 0.01$), hsa-miR-144 seviyesinin de 4.67 kat artmış ($p= 0.07$) olduğu görülmüştür. ALT'si normal değerin üzerinde olanlarda, normal aralıkta bulunan hastalara kıyasla hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908 ifade düzeylerinin sırasıyla 1.58 ($p= 0.438$) ve 2.64 ($p= 0.324$) kat artmış olduğu saptanmıştır.

Kohno ve arkadaşları[11], hsa-miR-1908'in fare ve insan HBV enfeksiyonunda, karaciğerde artmış olarak düzenlendiğini bildirmiştir. Çalışmamızda hasta grubunda hsa-miR-1908 ifade düzeyi sağlıklı kişilerden yüksek bulunmuştur. Kohno ve arkadaşlarının ileri sürdüğüne benzer şekilde bu artışın, KKKAV'nin en önemli hedef dokularından biri olan karaciğer üzerindeki etkisinden kaynaklanması mümkündür.

Virüsler insan kanserlerinin %12'sinin nedenidir[23]. Birçok çalışmada insan herpesvirüsü-8 (HHV-8) enfeksiyonlarının Kaposi sarkomuna neden olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle HHV-8 ile oluşan enfeksiyonlar, Kaposi-sarkomu-ilişkili-herpes virüs (KSHV) enfeksiyonu olarak da bilinir. Tuncer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada[23], KSHV hastalarında kontrollere göre hsa-miR-1908'in ifade seviyesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada da KKKA virüsünün neden olduğu enfeksiyonda, hsa-miR-1908 seviyesi benzer şekilde yüksek saptanmıştır.

Hsa-miR-1908 ile TNF-alfa arasında bir ilişki olduğu ve TNF-alfa'nın preadipositlerdeki hsa-miR-1908 ifadesini sınırladığı bildirilmiştir[14]. TNF-alfa viral enfeksiyona yanıtta önemli bir sitokindir ve KKKA hastalarında, yüksek serum TNF-alfa düzeyinin hastalık ciddiyeti ile ilişkili olduğu bildirilmiştir[16].

KKKA hastalarında ifade düzeyini araştırdığımız bir diğer miRNA da hsa-miR-144'tür. Çalışmamızda KKKA hastalarında hsa-miR-144 ifade düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla 11 kat azalmış olduğu saptanmıştır ($p= 0.91$). Song ve arkadaşlarının[24] çalışma sonuçları çalışmamızdaki verilerle benzerdir. Song ve arkadaşları yaptıkları çalışmada,

hsa-miR-144'ün CMV pozitif glioma dokularında ve CMV ile enfekte olmuş glioma hücre dizilerinde, kontrol dokularında olduğundan daha düşük bir ifade düzeyine sahip olduğunu göstermişlerdir.

Hsa-miR-144 viral hastalıklarda prognoz açısından önemlidir. Rosenberger ve arkadaşları farelerde yaptıkları çalışmada[20] hsa-miR-144'ün TRAF6-IRF7 yolunu zayıflatarak influenza A virüsü enfeksiyonunda antiviral yanıtı azalttığını göstermiştir. Çalışmamızda ölen olgularda yaşayan hastalara göre hsa-miR-144 ifade düzeyi 16.3 kat daha fazla bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p< 0.01$). Aynı durum klinik durumu ağır olan hastalarda da mevcuttur. KKKA hastalığı şiddetli olanlarda hsa-miR-144 ifade düzeyi, şiddetli olmayanlara kıyasla iki kat yüksektir. Rosenberger ve arkadaşlarının çalışmasına benzer bir durum KKKA için de geçerli olabilir. Yani KKKA hastalarında hsa-miR-144 ifade düzeyinin yüksek olması hsa-miR-144'ün, konağın virüse karşı verdiği immün yanıtı bozması ile ilişkili olabilir. Ancak bu konuda kesin bir yargıya varmak için ileri düzey çalışmalara ihtiyaç vardır.

COVID-19, viral bir hastalık olup asemptomatik seyredebileceği gibi çoklu organ hasarı ve ölüm gibi ağır tablolarla da sonuçlanabilir. COVID-19 hastalığında indüklenen miRNA'ları araştıran çalışmalarda miRNA'ların umut verici tanısal biyobelirteçler, hastalık şiddet/evre/faz göstergeleri, mortalite tahmin edicileri ve terapötik hedefler olabileceği bildirilmiştir[13]. COVID-19'un biyobelirteçleri olarak miRNA'ların gözden geçirildiği bir çalışmada hsa-miR-144'ün COVID-19 hastalarında sağlıklı gönüllülere göre daha düşük seviyelerde ifade edildiği gösterilmiş ve bunun, potansiyel bir tanısal biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir[13]. Çalışmamızda da benzer şekilde, KKKA hastalarında hsa-miR-144 ifade düzeyinin kontrol grubuna kıyasla azalmış olduğu saptanmıştır.

Madè ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada[18], COVID-19 tanılı hastalarda miRNA'ların, hastalığın erken döneminde, hastanın durumunu belirleme ve klinik sonucu tahmin etmedeki potansiyeli araştırılmıştır. Bu çalışmada, hastanede yatan COVID-19 hastalarında hsa-miR-144 plazma düzeyinin, kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşük olduğu saptanmış ve bu plazma miRNA seviyelerinin, hastaları kontrol grubundan doğru şekilde ayırabildiği bulunmuştur. Aynı çalışmada yazarlar, hastaneye yatırılarak izlenen COVID-19 hastalarında, dolaşımdaki hsa-miR-144 düzeyi ile COVID-19 şiddeti arasında bir ilişki olup olmadığını da araştırmış, bu amaçla hastaları, yaşayan ve ölen hastalar şeklinde iki gruba ayırmışlardır. Hsa-miR-144 plazma seviyesinin, ölen hastalarda yaşayan hastalara göre daha düşük olduğunu bulmuşlar ve ROC analizi ile, hsa-miR-144 seviyesinin, istatistiksel olarak anlamlı bir ayrıma izin verdiğini göstermişlerdir. Madè ve arkadaşlarının çalışmasında, dolaşımdaki hsa-miR-144 düzeyinin COVID-19 hastalarında, erken dönemdeki risk bazlı klinik durumun sınıflandırılmasında ve mortaliteyi tahmin etmede kullanılabilecek, non-invaziv bir araç olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızdaki sonuçlar da Madè ve arkadaşlarının çalışma sonuçlarına benzerdir. Çalışmamızda, KKKA hastalığını şiddetli geçiren hastalar ile şiddetli olmayan hastalar kıyaslandığında, hastalığı şiddetli olan bireylerde hsa-miR-144 ifadesinin iki kat artmış olduğu saptanmıştır. Ölen

olgular ile hayatta kalanlar kıyaslandığında ise, kandaki hsa-miR-144'ün ifade düzeyinin 16.3 kat artmış olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar, KKKA hastalarında plazma hsa-miR-144 düzeylerinin, hastalığın prognozu ve seyrini öngörmede kullanılabilecek bir biyobelirteç olduğunu düşündürmektedir. Aynı durum hastalığı şiddetli geçiren ve ölen olgularda artan hsa-miR-1908 için de geçerlidir. KKKA hastalığının şiddeti ve mortal seyredip seyretmeyeceğini erken dönemde öngören biyobelirteçlerin tanımlanması, hastalığın klinik yönetimi açısından değerlidir.

Hsa-miR-144, insan immün yetmezlik virüsü [human immundeficiency virüs (HIV)] enfeksiyonu olan hastalarda da çalışılmıştır. HIV-1 enfeksiyonu olan ve geç tanı konulan hastalarda genellikle CD4 hücre sayısı düşüktür. Hastalık riskine katkıda bulunan bu faktör birçok ek hastalık riskinin yanı sıra ölüm riskini de arttırır. Antiretroviral tedavi (ART), HIV-1 ile enfekte bireylerin çoğunda CD4 hücre seviyesini eski haline getirebilir. Hernández-Walias ve arkadaşları[25], seçtikleri miRNA'ların, HIV-1 ile enfekte bireylerde, ART tedavisi altında zayıf CD4 hücre iyileşmesine ilişkin potansiyel öngörüsü ve tanısal değerini araştırmak için bir çalışma yapmışlardır. Baskılayıcı ART tedavisine, zayıf CD4 hücre iyileşme yanıtı verecek HIV-1 ile enfekte kişileri daha erken belirlemek için ART başlangıcında öngörücü biyobelirteçleri bulmanın, HIV-1 ile enfekte bireylerin iyi yönetimi için önemli olduğunu vurgulayan araştırmacılar, hsa-miR-144 ifade seviyesinin optimal CD4 hücre iyileşmesi olan bireylerde artmış ve zayıf CD4 hücre iyileşmesi olan bireylerde ise azalmış olduğunu göstermişlerdir[25]. Hsa-miR-144'ün bazı enfeksiyonlarda TNF-a ve IFN-y gibi enflamatuvar sitokinleri inhibe ettiği bildirilmiştir[10]. Liu ve arkadaşları[10], aktif tüberküloz hastalarında, hsa-miR-144'ü aşırı ifade edilen miRNA'lardan biri olarak saptamıştır. Hsa-miR-144'ün, TNF-a ve IFN-y üretimini ve T hücre proliferasyonunu inhibe edebildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, hsa-miR-144'ün, sitokin üretimi ve T hücre proliferasyonunu modifiye ederek, tüberküloza karşı bağışık yanıtın düzenlenmesinde rol oynadığı sonucuna varmışlardır.

KKKA hastalarında erken dönemde prognozun etkili biyobelirteçler ile mümkün olan en doğru şekilde tanımlanması, hastaların takibi ile tedavi başarısı açısından ve klinisyene yol göstermesi bakımından önemlidir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, KKKA hastalarında, kandaki ifade düzeyi araştırılan hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908'in, hastalığın prognozu ve klinik ciddiyetini belirlemede yararlı olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, hsa-miR-144 ve hsa-miR-1908, KKKA hastalarında kullanılabilecek bir prognostik biyobelirteç olarak düşünülmeli ve daha geniş hasta gruplarında değerlendirilmelidir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 19.04.2017 ve Karar no: 2017-04/03).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. ICTV. Taxon details. Available from: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202300070&taxon_name=Orthonairovirus%20haemorrhagiae
2. Papa A, Mirazimi A, Köksal I, Estrada-Pena A, Feldmann H. Recent advances in research on Crimean-Congo hemorrhagic fever. J Clin Virol 2015; 64: 137-43. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.029
3. Sancakdar E, Güven AS, Uysal EB, Deveci K, Gültürk E. Important of angiopoietic system in evaluation of endothelial damage in children with Crimean-Congo Hemorrhagic fever. Pediatr Infect Dis J 2015; 34(8): 200-5. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000706
4. Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. Antiviral Res 2004; 64(3): 145-60. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.08.001
5. Bodur H, Akıncı E, Öngürü P, Uyar Y, Baştürk B, Gözel MG, et al. Evidence of vascular endothelial damage in Crimean-Congo hemorrhagic fever. Int J Infect Dis 2010; 14(8): 704-7. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.02.2240
6. Butt J, Swanepoel R, Shieh WJ, Smith JF, Leman A, Greer W, et al. Immunohistochemical and in situ localization of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus in human tissues and implications for CCHF pathogenesis. Arch Pathol Lab Med 1997; 121(8): 839-46.
7. Öztürk B, Kuşçu F, Tütüncü E, Şencan İ, Gürbüz Y, Tüzün H. Evaluation of the association of serum levels of hyaluronic acid, sICAM-1, sVCAM-1, and VEGF-A with mortality and prognosis in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. J Clin Virol 2010; 47(2): 115-9. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.10.015
8. Korkmaz M, Yıldırım Y, Özçelik H, Fadıloğlu Ç. A current problem: Crimean-Congo hemorrhagic fever. Fırat J Health Services 2008; 3: 67-85.
9. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. Genomics Proteomics Bioinformatics 2009; 7(4): 147-54. https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60044-3
10. Liu Y, Wang X, Jiang J, Cao Z, Yang B, Cheng X. Modulation of T cell cytokine production by miR-144* with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis. Mol Immunol 2011; 48(9-10): 1084-90. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.02.001
11. Kohno T, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, et al. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virüs replication by targeting core mRNA. J Viral Hepat 2014; 21(9): 89-97. https://doi.org/10.1111/jvh.12240
12. Duskova K, Nagilla P, Le HS, Iyer P, Thalamuthu A, Martinson J, et al. MicroRNA regulation and its effects on cellular transcriptome in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infected individuals with distinct viral load and CD4 cell counts. BMC Infect Dis 2013; 30(13): 250. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-250
13. Visacri MB, Nicoletti AS, Pincinato EC, Loren P, Saavedra N, Saavedra K, et al. Role of miRNAs as biomarkers of COVID-19: A scoping review of the status and future directions for research in this field. Biomark Med 2021; 15(18): 1785-95. https://doi.org/10.2217/bmm-2021-0348
14. Kuang Q, Li J, You L, Shi C, Ji C, Guo X, et al. Identification and characterization of NF-kappaB binding sites in human miR-1908 promoter. Biomed Pharmacother 2015; 74: 158-63. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.08.018
15. Papa A, Bino S, Velo E, Harxhi A, Kota M, Antoniadis A. Cytokine levels in Crimean-Congo hemorrhagic fever. J Clin Virol 2006; 36(4): 272-6. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.04.007
16. Kaya S, Elaldi N, Kubar A, Gursoy N, Yilmaz M, Karakus G, et al. Sequential determination of serum viral titers, virus-specific IgG antibodies, and TNF-α, IL-6, IL-10, and IFN-γ levels in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. BMC Infect Dis 2014; 14: 416. https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-416
17. Rosenberger CM, Podyminogin RL, Diercks AH, Treuting PM, Peschon JJ, Rodriguez D, et al. miR-144 attenuates the host response to influenza virus by targeting the TRAF6-IRF7 signaling axis. PLoS Pathog 2017; 13(4): 1-20. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006305
18. Madè A, Greco A, Vausort M, Miliotis M, Schordan E, Baksi S, et al. Association of miR-144 levels in the peripheral blood with COVID-19 severity and mortality. Sci Rep 2022 ;12(1): 20048. https://doi.org/10.1038/s41598-022-23922-2

19. Bakir M, Engin A, Gozel MG, Elaldi N, Kilickap S, Cinar Z. A new perspective to determine the severity of cases with Crimean-Congo hemorrhagic fever. J Vector Borne Dis 2012; 49(2): 105-10. https://doi.org/10.4103/0972-9062.213375

20. Bayyurt B, Arslan S, Engin A, Bakir M. HULC and 7SL RNA expression levels in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. J Med Virol 2018; 90(12): 1822-6. https://doi.org/10.1002/jmv.25264

21. Barbu MG, Condrat CE, Thompson DC, Bugnar OL, Cretoiu D, Toader OD, et al. MicroRNA involvement in signaling pathways during viral infection. Front Cell Dev Biol 2020; 8: 143 https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00143

22. Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, Leman PA, Mynhardt, JH, Harvey S. The clinical pathology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Rev Infect Dis 1989; 11(4): 794-800 https://doi.org/10.1093/clinids/11.Supplement_4.S794

23. Tuncer SB, Celik B, Akdeniz Odemis D, Kılıc Erciyas S, Sukruoglu Erdogan O, Avsar M, et al. miRNA sequence analysis in patients with Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus. Pathol Oncol Res 2022; 28: 1610055. https://doi.org/10.3389/pore.2022.1610055

24. Song J, Ma Q, Hu M, Qian D, Wang B, He N. The inhibition of miR-144-3p on cell proliferation and metastasis by targeting TOP2A in HCMV-positive glioblastoma cells. Molecules 2018; 23(12): 1-13. https://doi.org/10.3390/molecules23123259

25. Hernández-Walias F, Ruiz-de-León MJ, Rosado-Sánchez I, Vázquez E, Leal M, Moreno S, et al. New signatures of poor CD4 cell recovery after suppressive antiretroviral therapy in HIV-1-infected individuals: Involvement of miR-192, IL-6, sCD14 and miR-144. Sci Rep 2020; 10(1): 2937. https://doi.org/10.1038/s41598-020-60073-8