



**T. C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ST YÜKSELMESİ OLAN VE OLMAYAN AKUT MİYOKARD
İNFARKTÜSLÜ HASTA GRUPLARINDA MİKRORNA PROFİLİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Onur BOBUŞOĞLU

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Lülüfer TAMER

MERSİN - 2016



**T. C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ST YÜKSELMESİ OLAN VE OLMAYAN AKUT MİYOKARD
İNFARKTÜSLÜ HASTA GRUPLARINDA MİKRORNA PROFİLİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Onur BOBUŞOĞLU

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Lülüfer TAMER

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2015-TP3-1190 proje numarası ile desteklenmiştir.

MERSİN - 2016

TEŐEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim süresince, ayrıca zorlu ve uzun bir süreç olan tez yazımı ve çalışmalarını esnasında her türlü desteği veren, bu çalışmayı yönlendirip sorunların çözümünde yardımcı olan tez hocam Prof. Dr. Lülüfer Tamer'e,

Asistanlık eğitimim süresince sorularımı hiçbir zaman yanıtsız bırakmayan, her zaman beni destekleyen sayın hocalarım Prof. Dr. Gürbüz Polat, Prof. Dr. Gülçin Eskandari, Prof. Dr. Burak Çimen ve Doç. Dr. Necati Muşlu'ya,

Tezimin hasta gruplarının toplanmasında yardımlarını esirgemeyen değerli Kardiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Kalıcı dostluklar kurduğum ve birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım çalışma arkadaşlarım ve tüm Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına,

İyi ki onların evlatlarıyım dediğim anne ve babama, ağabeyleri olmaktan her zaman gurur duyduğum erkek ve kızkardeşime,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	10
Akut Koroner Sendrom	10
Epidemiyolojisi	10
Fizyopatolojisi	10
Etiyolojisi	13
Akut Koroner Sendrom Tipleri	14
Stabil Olmayan Anjina Pektoris	15
ST Segment Elevasyonsuz Miyokard İnfarktüsü	15
ST Segment Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü	16
Akut Miyokard İnfarktüsünün Komplikasyonları	16
Aritmiler	16
Kalp Yetmezliği	17
Kardiyojenik Şok	17
Akciğer Ödemi	18
Ani Ölüm	18
Post-Miyokardiyal İnfarktüs Sendromu	18
Flebit ve Emboli	18
Akut Koroner Sendromlarda Tanı	18
Klinik	19
Elektrokardiyografi	19
Biyokimyasal Belirteçler	21
Miyogloblin	21
Kreatin Kinaz	21
Laktat Dehidrogenaz	21
Kardiyak Troponinler	21
mikroRNA (miRNA) Tarihçe	22

Tanım	23
miRNA'ların Adlandırılması ve Sınıflandırılması	23
miRNA'lar Nerede Kodlanırlar	24
miRNA'ların Biyogenezi	24
miRNA'ların Fonksiyonu	28
miRNA'ların Hücre Dışına Salınımı	29
miRNA Temelli Tedavi Seçenekleri	30
Antogomirler (AntimiR, blokmiR); miRNA Antogonistleri	30
Anti-miR Oligonükleotid (AMO) Teknikleri	31
miRNA Sünger Tekniği	31
miRNA-Maskeleme Antisens Oligonükleotid Teknikleri (miR-Mask ODN)	32
miRNA Taklit Edici Teknikler (miR-Mimic)	32
GEREÇ ve YÖNTEM	34
BULGULAR	42
TARTIŞMA	49
SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	56
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	66
ŞEKİLLER DİZİNİ	68
TABLolar DİZİNİ	69

ÖZET

Koroner arter hastalığı (KAH), son yıllarda gelişmiş tanı, tedavi ve önleme yöntemleri olmasına rağmen ülkemizde ve tüm dünyada ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Akut miyokard infarktüsünün (AMI) ani meydana gelmesi, daha önceden tahmin edilememesi nedeniyle AMI için erken tanı belirteçlerinin saptanması çok önemlidir. Günümüzde gelişmiş tanı yöntemlerinin yanında son yıllarda AMI tanısı ile ilişkili olabileceği düşünülen diğer bir molekül miRNA'lardır. Bazı miRNA'ların ateroskleroz patogeneğinde ve kalp fonksiyonlarını düzenlemede rol oynadıkları gösterilmiştir. Örneğin miR-1 ve miR-133'ün myoblast diferansiyasyonunda, kardiyomyosit proliferasyonunda, kardiyak iletim sistemi düzenlenmesinde rol oynadığı daha önceki çalışmalarda saptanmıştır. Çalışmamızda AMI tanısı almış ST yükselmeli (STEMI) ve ST yükselmez (NSTEMI) hastalarda hsa-miR-1, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-150, hsa-miR208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR374a-5p, hsa-miR499a-5p ekspresyon düzeylerini araştırmayı amaçladık.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'na Akut Miyokard İnfarktüsü tanısı ile başvuran 25 ST yükselmeli (yaş ort: 59,9±11,0) ve 25 ST yükselmez (yaş ort: 64,24±11,1) hastalar ile tamamen sağlıklı 20 kişi kontrol grubu (yaş ort: 49,6±7,3) olarak çalışmaya dahil edildi. Hasta ve kontrol gruplarından 5mL'lik EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 2000xg'de 10 dk santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrıldı. miRNA'lar plazmadan miRNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) ile izole edildi. İzole edilen miRNA'lar Reverse Transcription kit (Fluidigm, USA) ile cDNA'ya dönüştürüldü ve elde edilen cDNA'lardan Dynamic Arrayler üzerinde yüksek kapasiteli Real-Time PCR sistemi (Fluidigm, Biomark, USA) kullanılarak miRNA ekspresyon analizi yapıldı.

Hasta grubunda kontrol grubuna göre, bakılan miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$). Sonuç olarak, miRNA'ların AMI tanısında erken bir biyobelirteç olabileceği düşünülse de daha ileri ve geniş popülasyonlu çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: mikroRNA, akut koroner sendrom, akut miyokard infarktüsü

ABSTRACT

Coronary artery disease (CAD) is the leading cause of deaths in our country and all over the world although improved diagnosis, treatment and prevention methods in recent years, Due to the sudden occurrence and unpredictability, the determination of early diagnostic markers of Acute myocardial infarction (AMI) is very important. Today, alongside the improved diagnostic methods, in recent years another markers which might be associated with a diagnosis of AMI are miRNAs molecules. certain miRNAs were shown to play a role in the pathogenesis of atherosclerosis and in regulating cardiac functions. For example, in earlier studies miR-1 and miR-133 were determined to play a role in myoblast diferansiyon, in cardiomyocyte proliferation and in regulating cardiac conduction system. In our study we aimed to investigate hsa- hsa-miR-1, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-150, hsa-miR208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR374a-5p and hsa-miR499a-5p expression levels in patients who had been diagnosed with AMI with ST elevation (STEMI) and non-ST elevation (NSTEMI).

25 ST-segment elevation (mean age: 59.9 ± 11.0) and 25 non-ST elevation (mean age: $64,24 \pm 11,1$) patients with the diagnosis myocardial infarction and 20 healthy control group (mean age: 49.6 ± 7.3) were enrolled in the study who applied to Mersin University Medical Faculty Health Research and Application Hospital Cardiology Department. Blood samples were taken from patients and controls to 5ml EDTA tubes, centrifuged at 2000xg for 10 minutes and then the plasma was separated. miRNAs were isolated by the plasma miRNA isolation kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). Isolated miRNAs was transformed to cDNA by Reverse Transcription kit (Fluidigm, USA) and miRNA expression analysis was performed using high capacity Real-Time PCR System (Fluidigm, Biomarker, USA) from cDNAs on Dynamic Arrays.

There is no significant increase or decrease detected in the expression miRNA levels in the patients group compared to control group ($p > 0.05$). In conclusion, miRNAs may be an early biomarker for the diagnosis of AMI however further and larger studies are needed.

Keywords: microRNA, acute coronary syndrome, acute myocardial infarction

GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner arter hastalığı (KAH), son yıllarda gelişmiş tanı, tedavi ve önleme yöntemleri olmasına rağmen ülkemizde ve tüm dünyada ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır^{1,2}.

Tüm ölüm sebeplerini değişik kategorilerde inceleyen Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre dünya genelinde yaklaşık yılda 7,2 milyon kişi hala KAH nedeniyle hayatını kaybetmektedir ve bu dünyadaki tüm ölümlerin % 12,2'sine karşılık gelmektedir. Özellikle gelir düzeyi yüksek ülkeler, düşük gelir düzeyine sahip ülkelere kıyasla KAH açısından daha yüksek riske sahiptir. Bu ülkelerde toplam ölümlerin % 16,3'ü KAH nedeni iken düşük gelir düzeyine sahip ülkelerde bu oran % 9,4'tür².

Türkiye'de KAH ve bu sebeple ölüme ait veriler temel olarak TEKHARF çalışmasına dayanmaktadır. Bu çalışmada erişkin yaş grubunda KAH prevalansı 1990 yılında % 3,8 olarak bulunmuştur. 2008 yılında elde edilen verilere göre ise her bin yetişkinin yüz beşi KAH hastasıdır. Bu sonuçlara göre ülkemizde KAH hasta sayısı her yıl yaklaşık % 6,4 yani 200 bin kişi, KAH prevalansı ise % 3 artmaktadır. On sekiz yıllık takipte koroner olaylara bağlı ölüm erkeklerde yılda binde 5,1 iken kadınlarda binde 3,4 olarak bulunmuştur. Tüm ölümlerin ise % 42'si KAH nedeniyle olmuştur¹.

Önümüzdeki 20 yılda da toplumun yaşam ortalamasının artması, nüfusun artması ve az gelişmiş ülkelerde de sigara kullanımının artması gibi nedenlerle, geliştirilecek muhtemel yeni tanı ve tedavi metotlarına rağmen KAH'na bağlı ölümlerin sayısında artış olacağı tahmin edilmektedir².

Ateroskleroz zemininde gelişen koroner plakların koroner arterleri kısmen ya da tamamen tıkanması sonucunda ortaya çıkan semptomların tamamı akut koroner sendrom (AKS) olarak isimlendirilir. AKS, aterosklerotik plağın yırtılması ve sonrasında oluşan tromboza bağlı koroner arter kan akımının kısmen ya da tamamen engellenmesi sonucu oluşmaktadır. Klinikte kararsız anjina pectoris, ST yükselmesi miyokard infarktüsü (NSTEMİ) ve ST yükselmeli miyokard infarktüsü (STEMİ) olarak karşımıza çıkmaktadır³.

Tanım olarak STEMI ile NSTEMI'nin farkı EKG'ye yansıyan ST segment yükselmesinin olup olmamasıdır. ST segment yükselmesinin varlığı STEMI tanısını koydurur, NSTEMI ise STEMI tanısının konulmaması durumu yani bir dışlama tanısıdır. ST-segment yükselmeli miyokard infarktüsü tanısı konulduğunda en az bir koroner arteri tamamen ve sürekli tıkayan, transmural miyokard iskemisine yol açan ve trombolizden yarar görmesi muhtemel olan bir trombüsün varlığı akla gelmektedir. Tersine NSTEMI tanısı konulduğunda ise bir koroner arteri tamamen tıkayamayan ya da kısa bir süre için tamamen tıkayabilen bir trombüs nedeniyle oluşan, transmural olmayan ya da kısa süreli transmural miyokard iskemisinin yol açtığı klinik tablodur⁴.

Akut miyokard infarktüsünün (AMI) ani meydana gelmesi, daha önceden tahmin edilememesi nedeniyle AMI için erken tanı belirteçlerinin saptanması çok önemlidir. Günümüzde gelişmiş tanı yöntemlerinin yanında son yıllarda AMI tanısı ile ilişkili olabileceği düşünülen diğer bir molekül miRNA'lardır^{5,6}.

mikroRNA (miRNA, miR)'lar, hücresel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev almaktadır. Evrimsel olarak birçok miRNA ve ilgili protein düzeneği, solucandan insana kadar geniş bir yelpazede, metazoan organizmalar içerisinde yüksek oranda korunur. Bu durum miRNA'ların hem gelişim hem de erişkin vücut döneminde önemli işlemleri yürüttüğünü düşündürmektedir. İnsan genomunda yüksek seviyede korunmuş, miRNA'ları kodlayan, yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir^{5,6}.

Bu güne kadar tespit edilmiş miRNA'ların sadece küçük bir kısmının biyolojik rolleri aydınlatılmıştır. Hedef genlerin ekspresyonunu azaltan olgun miRNA'lar, protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. Kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahip miRNA'lar, baz çiftleşme özelliği ile messenger RNA (mRNA)'ya bağlandıktan sonra ya mRNA'nın yıkımına ya da pre veya posttranslasyonel basamakta protein translasyonunun inhibisyonuna sebep olurlar. Tespit edilen insan miRNA'larının %50'sinin genomda kırılğan alan olarak bilinen alanlarda bulunduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir^{5,6}.

AKS'larda hedef erken tanı ve tedavi ile ortaya çıkabilecek morbidite ve mortalitenin azaltılmasıdır, fakat dünyada gelişmekte olan tanı ve tedavilere rağmen hala en önemli morbidite ve mortalite sebebi olmaya devam etmektedir⁷. AMI tıbbi bir acildir ve tanı, tedavisi ne kadar erken gerçekleştirilirse yarar da o kadar büyük olmaktadır^{8,9}.

Bazı miRNA'ların ateroskleroz patogeneğinde ve kalp fonksiyonlarını düzenlemede rol oynadıkları gösterilmiştir. Örneğin miR-1 ve miR-133'ün myoblast diferansiyasyonunda, kardiyomyosit proliferasyonunda, kardiyak iletim sistemi düzenlenmesinde rol oynadığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir⁶.

Bu çalışmada, daha önceki araştırmalarda AMI tanısı almış hastalarda ekspresyon değişimleri açısından ortak fikir oluşturmuş miRNA'lardan hsa-miR-1, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-150, hsa-miR208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR374a-5p ve hsa-miR499a-5p ekspresyon düzeylerini ST yükselmesi olan ve olmayan miyokard infarktüslü hasta gruplarında araştırmayı amaçladık.



GENEL BİLGİLER

Akut Koroner Sendrom

Akut koroner sendrom (AKS), akut miyokard iskemisi sonucunda ortaya çıkan semptomların tamamına verilen isimdir. AKS, aterosklerotik plağın yırtılması ve sonrasında oluşan tromboza bağlı koroner arter kan akımının kısmen ya da tamamen engellenmesi sonucu oluşmaktadır. Klinikte kararsız anjina pectoris, ST yükselmesiz miyokard infarktüsü ve ST yükselmeli miyokard infarktüsü olarak karşımıza çıkmaktadır³.

AKS'larda hedef erken tanı ve tedavi ile ortaya çıkabilecek morbidite ve mortalitenin azaltılmasıdır, fakat dünyada gelişmekte olan tanı ve tedavilere rağmen hala en önemli morbidite ve mortalite sebebi olmaya devam etmektedir. Koroner kalp hastalıkları tüm ölümlerin üçte birini oluşturmaktadır⁷.

Akut miyokard infarktüsünün (AMI) insidansının 250 veya 500'de bir arasında olduğu tahmin edilmektedir. Prevalans çalışmalarından elde edilen verilere göre toplumdaki erkeklerin yaklaşık %4'nün ve kadınların yaklaşık %2'nin miyokard infarktüsü geçirdiği tahmin edilmektedir. AMI tıbbi bir acildir ve tanı, tedavisi ne kadar erken gerçekleştirilirse yarar da o kadar büyük olmaktadır^{8,9}.

Epidemiyolojisi

Akut koroner sendromların ilk ayda %30-%50 arasında mortaliteye sahip olduğu ve bu ölümlerin yaklaşık yarısının ilk 2 saat içinde olduğu gösterilmiştir^{10,11}. Fibrinolitikler, antitrombositler ajanlar ve koroner girişimlerin yaygın kullanımı ile 1 aylık mortalitenin %6-7'ye kadar düştüğü rapor edilmiştir¹². Yapılan European Heart Survey analizinde ST segment elevasyonlu AKS'ların 1 aylık mortalitesinin %8.4 olduğu gösterilmiştir¹³.

Fizyopatolojisi

Ateroskleroz, çoğunlukla lipid toplanmasına bağlı olarak orta ve büyük boyutlu arterlerde ortaya çıkan kronik, multifokal, immüninflamatuvar ve fibroproliferatif bir hastalıktır¹⁴. Ateroskleroz yaşamın erken dönemlerinde başlar ve ilerlemesi yıllar boyu yavaş bir şekilde devam eder. Bu yavaş ilerlemeyi ani bir şekilde sonlandıran,

akut koroner sendromlara neden olan olay çoğunlukla plak stabilizasyonunun bozulmasına bağlı gelişen akut trombozdur^{15,16}. Kararsız anjina pektoris ve miyokardiyal infarktüste, aterosklerozun akut komplikasyonu olan trombozis rol oynar. Akut trombotik olayların patofizyolojisinde ise inflamasyon yer almaktadır¹⁷. Aterosklerotik plağın oluşumu lipid birikimi, endotel disfonksiyonu ve inflamasyonu içeren karmaşık bir süreçtir. Plak oluşumunu başlatan mekanizma henüz tam olarak anlaşılammıştır. Fakat aterosklerozun erken döneminde dolaşımdaki düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL), arter duvarının en iç tabakasında (intima) okside olmasının aterosklerozun ortaya çıkmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir⁷.

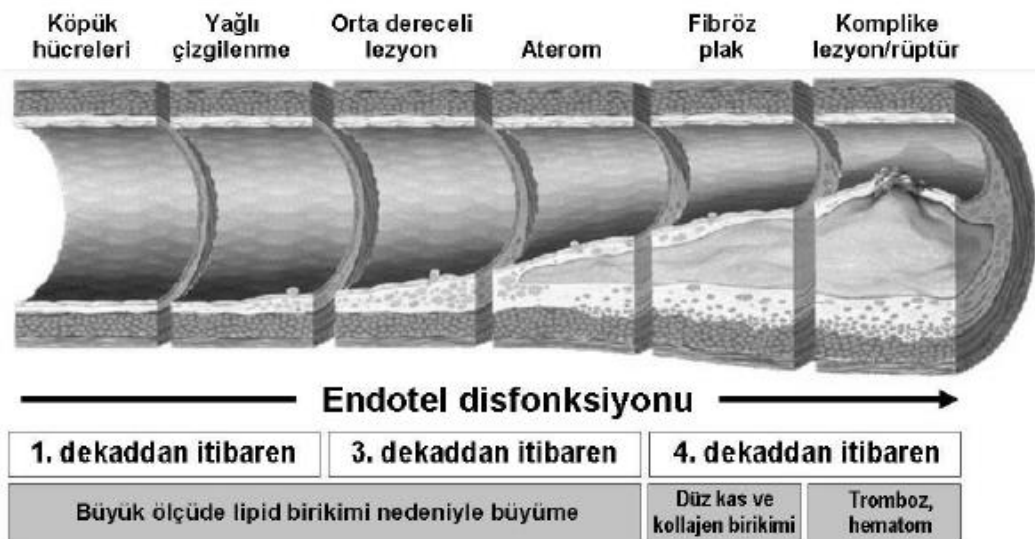
Miyokard infarktüsünün etiopatogenezinde arterit, travma, diseksiyon, emboli gibi ender görülen durumlar dışında genelde ateroskleroz ve aterotromboz yatmaktadır¹⁸. AKS'dan sorumlu bütün koroner trombüslerin %75'ine plak rüptürü neden olmaktadır¹⁹. Koroner plakların çoğu ömür boyu klinik açıdan stabil olarak kalmaktadır. Ancak hassas plaklar stabil olmayıp kısa dönemde yüksek tromboz riski taşımaktadır²⁰.

Seri anjiyografik ve patoanatomik gözlemler koroner arter hastalığının temelde iki farklı zeminde yol aldığını gösterirler. Bunlardan birincisi fikse, geri dönüşümü zor olan, kademeli lümen daralmasına yol açan aterosklerozdur. İkinci yol ise potansiyel olarak geri dönüşümlü, dinamik yapıda, öngörülemez şekilde yavaş ilerleyen fazı kesintiye uğratıp, hızlı koroner tam tıkanıklığa yol açabilen tromboz ya da vazospazm yoludur. Genel olarak aterosklerozun baskın olduğu lezyonlar kronik stabil anjina pektoris kliniğinden sorumlu iken aterotromboz ise akut koroner sendromlardan sorumlu olan lezyonların ana komponentidir^{21,22}.

AKS koroner plağın, incelmış olan fibröz kapsülünün yırtılması ile başlar. Hassas plağın yırtılması için çoğu zaman tetikleyici bir faktöre ihtiyaç vardır. Fakat AKS oluşumu için tetikleyici faktör her zaman şart değildir. Plağın hassas ve büyük olması AKS oluşumu için en önemli rolü teşkil eder. Plak yırtılması sıklıkla plağın büyümesi esnasında görülür. Bunun sonucunda trombüs oluşumu gözlenir. Koroner plak yırtılması esnasında, fibrinoliz, trombosit ve koagülasyon aktivasyonu arasındaki ilişki oldukça önemlidir. Plak yırtılmasına karşı dinamik bir trombotik cevap süreci izlenmektedir. Tromboz ve tromboliz bu süreç içinde birlikte oluşur. Bu süreçte koroner akım tıkanması ve distal emboliler gözlenir. Bu distal emboliler nedeni ile koroner arter rekanalize edilse de miyokard reperfüzyonu tam olarak sağlanamaz. Meydana gelen bu durum hastalığın uzun dönem seyrinde oldukça önemlidir²³. Akut

koroner sendromda anormal vazospazm da sık görülür. Bu spazmlar genel olarak sorumlu lezyon bölgelerinde sınırlıdır. Bu duruma o bölgeden salınan mediyatörlerin neden olduğu düşünölmektedir²⁴.

Akut koroner sendromda erken dönemde vasköler inflamasyon oluşumunda makrofaj aktivasyonu ve serbest radikal salınımı ilk sırada yer almaktadır. Bunun sonucunda metallerproteinazlar aktive olur ve plak destabilize olur. Paradoks vazokonstriksiyon görölmektedir. Bu duruma endotel disfonksiyonu eşlik etmektedir. Doku faktörü ve endotel kaynaklı apoptotik mikropartiköllerin tetiklediği protrombotik uyarı artmaktadır. Bunun sonucunda nitrik oksit, prostasiklin, protein C ve S, doku plazminojen aktivatörü oluşumu ve aktivitesinde denge bozukluğu meydana gelir²⁵. Endotel disfonksiyonu sonucu nitrik oksit salınımı ve biyoyararlılığı azalırken, endotelin-1, anjiyotensin ve oksidan vazoaktif maddelerin salınımı artış göstermektedir. Bütün bu bilgiler ışığında endotel disfonksiyonu, KAH'ın tüm safhalarında ve komplikasyonlarında en önemli patogenezi oluşturmaktadır²⁶. Plak rüptürü veya erozyonu sonucu gelişen AKS' da inflamasyon sadece sorumlu plak bölgesinde artış göstermez. Aynı zamanda tüm sistemik dolaşım ve diğör plaklarda da inflamasyon artışı mevcuttur²⁷. Sistemik inflamasyon, periferik kan damarlarındaki inflamasyon belirteçleri ve akut faz reaktanlarının tespiti ile belirlenir. Miyokard infarktüsü koroner arterin tamamen tıkanması ve şiddetli iskemi sonucu 15-20 dakika içinde gelişir. Tıkalı koroner arterin beslediği alanda şiddetli iskemi ilk olarak subendokardiyal alanda gözlenir ve epikardiyal alana doğru ilerler²⁸. Ateroskleroz oluşum süreci Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil.1. Ateroskleroz oluşum süreci²⁹

Etiyolojisi

AKS'larda ortak etiyoloji, ateroskleroz zemininde gelişen koroner plakların koroner arterleri kısmen ya da tamamen tıkaşmasıdır^{22,30}.

Ateroskleroz, genler ve çevre faktörleri arasındaki çok sayıda ve karmaşık etkileşimin bir sonucudur. Yapılan araştırmalar aterosklerotik klinik olayların insidansının çok fazla varyasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır. Örneğin orta yaştaki erkeklerde akut miyokard infarktüsü (AMI), aynı yaştaki kadınlara göre 3-4 kat daha fazladır. Aterosklerotik hastalıkların insidansı nispeten kısa süreler içerisinde hem olumlu hem de olumsuz yönde radikal olarak değişebilmektedir. Bu değişiklikler sadece genetik faktörlerle açıklanamamaktadır. Bu durum akla çevresel ya da davranışsal değişikliklerin etkilerini getirmektedir. Tüm toplumlarda yapılan çalışmalar, aterosklerotik hastalıklara bağlı zararları azaltmaya yönelik programların planlanması ve değerlendirilmesine yöneliktir. Bu çabaların nerelerde yoğunlaşması gerektiğini belirlemek için, aterosklerozun modifiye edilebilir risk faktörlerini ve bunların toplum içerisinde nasıl dağıldığını anlamak gerekir³¹ (Tablo.1).

Tablo.1. Aterosklerotik Kalp Hastalığı İçin Risk Faktörleri³¹

Sabit Faktörler	Modifiye Edilebilen Faktörler	Yeni Risk Faktörleri
Yaş	Sigara	Homosistein
Aile Hikayesi	Hipertansiyon	Lipoprotein-a
Etnik Köken	Hiperlipidemi	Fibrinojen, PAI-1, vWF Antijeni
Cinsiyet	Diyabet, İnsülin Rezistansı	Oksijen Radikalleri/ İnflamasyon
	Obezite/ Bel Çevresi	Apo A1- Apo B
	Sedanter Yaşam	LDL- Okside LDL
	Mental Stres, Depresyon	Hipertrigliseridemi, Trans Yağlar

Vaka-kontrol ve kohort çalışmaları, sigara, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve sedanter yaşam tarzının her birisinin AMI için bağımsız risk faktörleri olduğunu göstermektedir^{32,33}. Bu faktörlerin her biri riski en az iki kat arttırmaktadır. Bağımsız olmaları, diğer faktörler olmasa da bu yüksek riskin var olduğu anlamına gelir. Ancak risklerin azaltılmasıyla sağlanacak kesin yarar kişinin sabit faktörleriyle belirlenen zemindeki riskine bağlıdır. Bu nedenle 60 yaşındaki bir kişide, hipertansiyonun etkili

bir şekilde tedavisi 40 yaşındaki bir kişide aynı tedaviye göre daha fazla sayıda aterosklerotik olayı önleyecektir³¹.

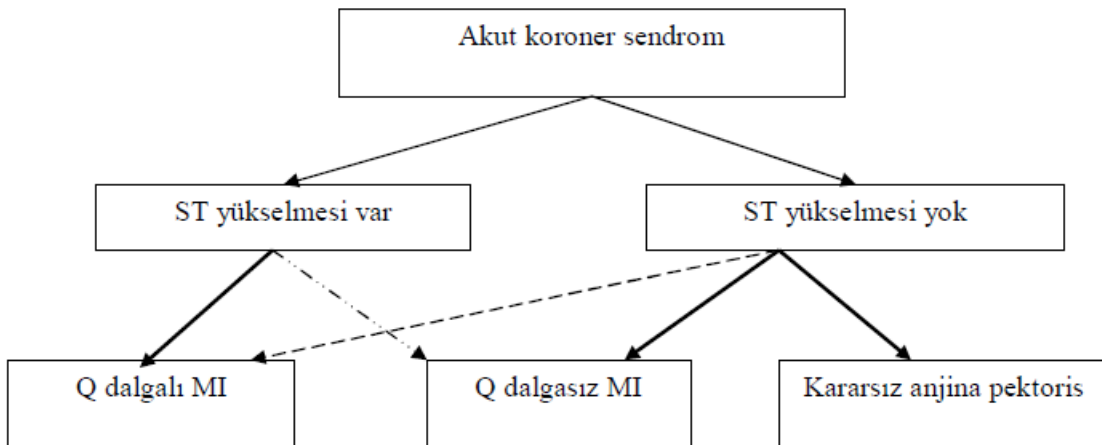
Akut Koroner Sendrom Tipleri

Akut koroner sendrom başlığı altında klinik bulgular, elektrokardiyografi ve biyokimyasal belirteçler kullanılarak üç ayrı klinik tanımlama yapılmıştır³⁴ (Tablo 2).

Tablo.2. Akut Koroner Sendrom Tipleri⁴

ST Elevasyonlu	ST Elevasyonsuz
Q dalgalı/ Q dalgasız	Non ST Elevasyon Miyokard İnfarktüsü
	Stabil Olmayan Anjina

Akut koroner sendrom, başvuru EKG'sinde ST-segmentine göre ST-segment yükselmesi olan ve olmayan olarak iki grupta incelenir. ST-segment yükselmesi olan AKS hastalarının büyük çoğunluğunda Q dalgalı, daha azında Q dalgasız MI gelişir. ST-segment yükselmesi olmayan AKS, kararsız angina ve ST segment yükselmez MI'dan oluşmaktadır. Bu iki klinik durum kardiyak enzim yüksekliği ile birbirinden ayrılabilir. Kardiyak enzimlerde anlamlı yükselme olursa ST-segment yükselmez MI olarak tanımlanır. ST-segment yükselmesi olmayan MI hastalarının büyük bir kısmında Q dalgası gelişmezken az bir kısmında Q dalgalı MI gelişebilir³⁴ (Şekil.2).



Şekil.2. ST Yükselmeli ve ST Yükselmez Miyokard İnfarktüsü Tipleri⁴

Stabil Olmayan Anjina Pektoris

Daha önceden kararlı (stabil) olan anjınının daha düşük dereceli egzersiz ile veya istirahatta oluşması, daha uzun sürmesi ve ilaçlara yanıtının azalmasına stabil olmayan anjina pektoris (USAP) adı verilmektedir. Kararsız anjina, yeni başlamış olan ve efor ile gelen göğüs ağrısı durumlarında da uygun bir tanımlama olarak kabul edilmektedir. USAP, miyokard nekrozunu içermeyen bir akut koroner sendromdur. ST elevasyonsuz miyokard infarktüsü (NSTEMI) ise esas olarak miyokard nekrozu ile seyreden, ancak EKG'de ST elevasyonunun izlenmediği, koroner kan akımında ciddi bozulma veya geçici kesintiye neden olan bir akut koroner sendrom tipidir. USAP ve NSTEMI birbiriyle ilişkili klinik tablolardır. Patogenez ve klinik prezentasyonları benzerdir, ancak NSTEMI'da iskemi daha şiddetli, daha yaygın ve daha uzun sürelidir. Bunun sonucu olarak NSTEMI'da geri dönüşümsüz miyokard hasarı vardır¹².

USAP, günümüzde koroner yoğun bakım ünitelerine kabulün birincil nedenidir ve tüm sebeplerin %30-50'sini oluşturur. Bu oran STEMI ile başvuran hastaların yaklaşık 3 katıdır. Anstabil koroner arter hastalığı, heterojen bir klinik sendromdur. USAP ve NSTEMI, sadece kardiyak markerlerin sonuçları alınınca kesin olarak ayırt edilir³⁵.

ST Segment Elevasyonsuz Miyokard İnfarktüsü (NSTEMI)

AKS kliniği olan, fakat dirençli ST segment yükselmesi bulunmayan hastalar USAP veya ST Segment Elevasyonsuz Miyokard İnfarktüsü (NSTEMI)'dir. EKG'de ST segment elevasyonunun olmadığı durumda miyokard nekrozu olduğunu kanıtlayan kardiyak biyobelirteçlerin yüksekliğine bakılarak NSTEMI tanısı konulur. Kardiyak biyobelirteç yüksekliğinin saptanması USAP'a göre daha objektif bir tanı imkanı sağlar³⁶.

ST yükselmesiz AKS'den sorumlu lezyon, sıklıkla yırtılmış veya erozyona uğramış plak içinde tam tıkanıklığa yol açmayan trombosit zengin, beyaz trombüstür³⁶.

EKG bulguları, ST segment çökmesi, kendiliğinden veya nitrogliserinle geçebilen ST segment yükselmesi, T dalga inversiyonu, geçirilmiş MI bulgusu ve sol dal bloğu olabilir. EKG tamamen normal de olabilir. USAP veya NSTEMI'lı hastalarda ölüm veya reinfarktüs riski ilk 30 gün boyunca yaklaşık %10'dur. ST-segment

yükselmesi olmayan AKS'lu hastaların yaklaşık %35-%50'si medikal tedaviye rağmen tekrarlayan iskemiyle karşılaşılabilir³⁷⁻³⁹.

ST Segment Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (STEMI)

Akut koroner sendromlar içerisinde mortalitesi en yüksek olan gruptur. Hastalar 30 dakikadan uzun süren göğüs ağrısı, ardışık çekilen elektrokardiyogramlarda dinamik değişiklikler ve miyokard hasarını gösteren kardiyak biyobelirteçlerin artıp azalmasıyla karakterizedir⁴⁰. Hastanın semptomları ve EKG değişiklikleri tanı koydurucu olsa da, hastaların 1/3'lük kısmında herhangi bir göğüs ağrısı olmayabilir, bunun yanında ST segment elevasyonu klinikte başka durumlarda da görülebilir. Tüm bu sebeplerden dolayı miyokard infarktüsünün en spesifik bulgusu kardiyak biyobelirteçlerdeki yükselmedir. ST Segment Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (STEMI) acil revaskülarizasyon gereksinimi açısından hızlı ve doğru şekilde tanı konulması gereken bir durumdur⁴¹.

Akut Miyokard İnfarktüsünün Komplikasyonları

Akut miyokard infarktüsünden sonraki ilk yıl içinde görülen ölümlerin yaklaşık %25'i, hastaneye yatışın ilk 48 saati içinde olmasından dolayı komplikasyonların erken dönemde kontrolü önem taşımaktadır⁴².

Aritmiler

En önemli sık bir komplikasyon olarak aritmiler ön sırada gelmekte ve AMI geçiren hastalardaki tüm ölümlerin en büyük nedenini oluşturmaktadır⁴³.

a) Ventriküler Fibrilasyon ve Flutter : Ventriküler fibrilasyon EKG'de düzensiz, küçüklü, büyüklü titreşimler görülür. Dakikadaki sayısını bulmak güç olmakla beraber 150-300 arasında değişir. Ventriküler flutterde QRS kompleksi,ST segmenti ve T dalgası ayrılabilir olmaktan çıkmıştır. Geniş oldukça düzenli,birbirine benzeyen kaba dalgalar bulunur. Hız 150-250/dk arasındadır⁴³.

Erken ölümlerin %90'ından fazlasının nedeni ventriküler fibrilasyondur. Bu aritminin ve habercilerinin hemen tanınıp tedavi edilmesi, AMI'nden ortaya çıkan ölüm oranlarının azalmasında başrolü oynamaktadır⁴³.

b) Ventriküler Taşikardi: Ventriküler erken vuruların arka arkaya gelmesi halidir. P dalgaları bulunamaz. Hız 150-180/dk'dır. T dalgası genellikle QRS kompleksinin aksi yönündedir. Kompleksler birbirine benzer ve ritm düzenlidir⁴³.

c) Ventriküler Erken Atımlar (Ventriküler Ekstrasistoller): Akut miyokard infarktüsünün ilk anından itibaren, %60-80 gibi büyük bir sıklıkla çıkan önemli bir ritim bozukluğudur. EKG'de geniş, çok zaman çentikli, önünde P dalgası bulunmayan, erken gelmiş bir QRS kompleksi hemen daima 0,12 sn veya daha geniştir. Ventriküler erken vuruları hemen her zaman pause dönemi izler⁴³.

d) Atrio-ventriküler İleti Kusurları: Akut miyokard infarktüsünde A-V ileti kusurlarına oldukça sık rastlanmaktadır. Postero-inferior infarktüslerde A-V tam blok daha sıklıkla görülmektedir⁴³, 2. ve 3. derece kalp bloklarında acil müdahale gerekir ve endikasyonu halinde pace-maker uygulanır^{42,44}.

Kalp Yetmezliği

Akut miyokard infarktüsü geçiren hastaların hemen hemen tamamında hatta komplikasyonsuz olanlarda bile ilk günlerde gizli sol ventrikül fonksiyon bozukluğu hemodinamik bulgularla saptanmıştır. Klinikte ortaya çıkan belirtiler infarktüs alanının büyüklüğüne, sol ventrikül dolma basıncındaki yükselmeye ve kalp dakika hacmindeki azalmanın derecesine bağlıdır. Klinik belirtilere göre AMI'nden sonra oluşan kalp yetmezliğine bağlı mortalite oranı %3-5 ile %85 arasında değişmektedir^{43,45}.

Kardiyojenik Şok

Akut miyokard infarktüsünün en erken ve en ciddi komplikasyonudur. Gelişme nedeni; aşırı hasar görmüş olması nedeni ile bir pompa olarak sol ventrikül performansının düşmesidir. Şokun ortaya çıktığı AMI vakalarında mortalite %80'in üzerindedir. Sistolik kan basıncı 90 mmHg'nin altına düştüğünde hastada huzursuzluk, zihin bulanıklığı, taşikardi, siyanoz görülür. İdrar miktarı saatte 20 ml'nin altına indiğinde deri ve ekstremiteler nemli ve soğuktur. Kardiyojenik şoku önlemek için; hızla ağrıyı gidermek, infüzyonla dolaşım kollapsı ve şokun gelişmesini önlemek, oksijen vermek, anti-aritmik ilaçlarla aritmiyi tedavi etmek, mikrodolaşımı desteklemek için vazodilatatör ilaçlar vermek, santral venöz basıncı sürekli kontrol etmek, kalbin kasılma gücünü ve kardiak out-put'u artırarak doku perfüzyonunu sağlamak gerekir⁴⁵.

Akciğer Ödemi

Akut miyokard infarktüsünün herhangi bir döneminde ortaya çıkabilir. Sol ventrikül anevrizması, interventriküler septumun rüptürü, papiller kas kopması sonucu mitral kapak yetmezliği gibi AMI'nden sonra görülen diğer komplikasyonlar da akciğer ödemi oluşmasını kolaylaştırır. AMI sonrası akciğer ödeminin oluşma sıklığı %60'dır^{42,44}.

Ani Ölüm

Akut miyokard infarktüsü vakalarının yarısı tıbbi yardım görebilecek veya hastaneye yetiştirilebilecek kadar hayatta kalmamaktadır. Mortalitenin en yüksek olduğu zaman ilk saatlerdir. Ani ölüm vakalarının en büyük bölümünden muhtemelen primer ventriküler fibrilasyonu sorumludur. Bazı hastalarda da birden meydana gelen kalp bloğu daha sonra oluşan hipotansiyon ve hipotansiyonun izlediği şiddetli bradikardi kardiak arresti başlatabilmektedir^{43,45}.

Ani ölüm daha az olarak infarktüsün iyileşme döneminde görülebilir. Bu geç ani ölümlerde, ventriküler fibrilasyon gene ön sırada bir sebeptir. Yeni bir infarktüsün ortaya çıkması, pulmoner infarktüs veya kalp rüptürü gibi komplikasyonlar da geç dönemdeki ani ölümlerin nedenleri arasındadır⁴³.

Post-Miyokardiyal İnfarktüs Sendromu

Hastaların %3-4'ünde gelişen komplikasyondur. İnfarktüsü izleyen ilk iki ay içinde hastada çoğunlukla fibrinöz perikardit gelişir. Bu duruma virüslerin veya otoimmün reaksiyonların neden olduğu sanılmaktadır. Hastada göğüs ağrısı, yüksek ateş, dispne, pnömoni, lökositoz, perikardit ve kalp tamponadı oluşabilir⁴⁵.

Flebit ve Emboli

Akut miyokard infarktüsünden sonra uzun süren yatak istirahatinde kan viskozitesi ve kanın pıhtılaşma özelliği artar veya pelvik venlerde flebit meydana gelir. Emboliyi önlemek için ayak ve bacak yeterince hareket ettirilmelidir. Koruyucu olarak da antikoagülan tedavi uygulanabilir⁴⁵.

Akut Koroner Sendromlarda Tanı

Akut koroner sendrom, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirlediği 3 tanısal kriterden en az ikisinin varlığı olarak kabul edilmektedir. WHO'nun belirlediği bu

kriterler; akut, ciddi ve uzamış göğüs ağrısı, önemli elektrokardiyografik değişikliğin varlığı ve geleneksel serum enzim aktivitelerinde net anormal artıştan oluşmaktadır⁴⁶.

Klinik

ST segment yükselmeli miyokard infarktüsü (STEMI) ayırıcı tanısında oldukça önemlidir. STEMI oldukça geniş bir semptom ve klinik tablo ile karşımıza çıkmaktadır. En önemli semptom iskemik göğüs ağrısıdır. Akut miyokard infarktüsünde semptomlar genellikle önceden asemptomatik olan kişilerde aniden ortaya çıkar. Ağrı genellikle istirahat esnasında başlar. Bazen cerrahi girişim, travma, hemoraji ve hipotansiyon neticesinde de semptomlar tetiklenebilir. Göğüs ağrısı genellikle retrosternal bölgede, tam olarak lokalize edilemeyen, baskı, sıkışma, basınç hissi ya da yanma şeklinde tariflenen, sıklıkla sol kol ve sırta yayılan karakterdedir. İstirahatle ve nitrogliserin ile geçmez ve 20 dakikadan daha uzun sürer. Göğüsteki sıkıntı hissi boyuna, alt çeneye, bileklere, sırta, omuza, sağ kola, epigastriyuma da yayılabilir. Yapılan çalışmalar, toplumda insanların %30 oranında sessiz Mİ geçirdiğini göstermiştir²⁹. Akut miyokard infarktüsü özellikle yaşlı, diyabetik ve postoperatif hasta grubunda göğüs ağrısı olmaksızın da gelişebilir⁴⁷. Akut miyokard infarktüsü ile ilişkili diğer semptomlar terleme, nefes darlığı, halsizlik, çarpıntı,baş dönmesi, bilinç bulanıklığı, bulantı, kusma ve hazımsızlık olarak sayılabilir. Gastrointestinal sistem ile ilişkili semptomlar özellikle inferior infarktüslerde sık gözlenir. STEMI oluşumunda sirkadiyen bir ritim gözlenmektedir. Bu durum daha çok katekolamin, kortizol salınımına ve trombosit agregasyonundaki artışa bağlıdır. Ayrıca STEMI karşımıza atipik semptomlar ile de çıkabilmektedir. Bu durum genel olarak genç (25-40 yaş) veya yaşlı (75 yaş üzeri), diyabetik ve bayan hastalarda görülebilir⁴⁸.

Elektrokardiyografi

Akut miyokard infarktüsünün kendine özgü elektrokardiyografik (EKG) bulguları vardır. Özellikle 24 saat sonra EKG'de anormal Q dalgası, R kaybı, ST değişiklikleri, T negatifliği, QT süresinin uzaması görülebilmektedir^{45,49,50}. AMI'ne uğramış bölgenin ortasında nekroz, çevresinde lezyon ve en dışta da iskemi yer almaktadır. EKG'de Q ve QS nekrozu, ST yükselmesi lezyonu, T negatifliği iskemiye belirtmektedir⁴⁵.

İnfarktüsün akut olup olmadığı EKG ile tanılanır. En önemli tanı aracı EKG'dir. Çok değerli bilgiler verir. AMI'de 12 derivasyonlu EKG çekilir. Akut dönemde EKG'de ST segmenti ve T dalgası yükselir ve sivrileşir. Hastalığın gelişme döneminde ST

izoelektrik çizgiye yaklaşırken T negatifleşir. (Zedelenme ile ilgilidir,günler,haftalar ya da daha uzun sürebilir) Anormal Q dalgası nekroza bağlı oluşur. Oluşan bu Q dalgası EKG'de genellikle hayat boyu kalır^{42,51,52}.

EKG, AMI'nün lokalizasyonunu ve klinik seyrini göstermede yararlıdır^{45,49}. Akut MI; EKG görüntüleri yardımıyla klinik gidiş bakımından; akut, subakut, kronik, anatomik lezyon bakımından; transmural, intramural, subendokardiyal, lokalizasyon bakımından; anterior, anteroseptal, anterolateral, inferior ve posterior olarak sınıflandırılır.

- 1- Subendokardial infarktüs: aVR de ST elevasyonu, diğer derivasyonların çoğunda ST depresyonu
- 2- Subepikardiyal İnfarktüs: Bazı derivasyonlarda ST elevasyonu
- 3- İntramiyokardiyal İnfarktüs: Bazı derivasyonlarda T negatifliği
- 4- Anteroseptal İnfarktüs: V1, V2'de Q dalgası
- 5- Anterior İnfarktüs: V1, V4 'de Q dalgası
- 6- Anterolateral İnfarktüs: V4, V6'da Q dalgası
- 7- Yaygın Anterior İnfarktüs: V1, V6'da Q dalgası
- 8- İnférieur İnfarktüs: D2, D3 ve AVF'de Q dalgası, ST yükselmesi
- 9- Posterior İnfarktüs: V1'de R dalgasının yükselmesi
- 10- Sağ ventrikül İnfarktüsü: V1'de ST yükselmesi, RV4'de ST yükselmesi^{44,45,49,50}

STEMI'nün şematik görünümü şekil 3'te verilmiştir.

Seyrek olarak, klinik tablo tamamen infarktüsü düşündüğü halde EKG değişikliklerinin ortaya çıkışı 5-7 gün gecikebilmekte, %15 olguda EKG normal bulgular verebilmektedir⁴⁵.



Şekil.3. ST Segment Yükseklik Şekillerinin Şematik Görünümü A: Konkav Tip B: Düz Tip C: Konveks Tip⁵³

Biyokimyasal Belirteçler

Miyogloblin

Miyogloblin, düşük molekül ağırlıklı molekül olması ve hücre içi yüksek konsantrasyonlarda bulunmasından dolayı MI'dan 1-3 saat sonra kanda hızla yüksek düzeylere ulaşır. Miyogloblin, 5-10. saatte pik seviyesine ulaşır ve 24-36 saat içinde de normale döner. Miyogloblinin iskelet kasında da bulunması tanı özgüllüğünü kısıtlar. Semptomların ilk 4-8 saatleri içinde diğer biyokimyasal belirteçler yükselmedikçe akut koroner sendrom lehine yorumlanmamaktadır⁵⁴.

Kreatin Kinaz

Kreatin Kinaz (CK) ve miyokardiyal izoformu olan CK-MB'nin seviyeleri akut MI'nın başlangıcından 4-8 saat sonra yükselmeye başlar, 24. saatinde pik yapar ve 36-48 saatte normale döner. Ancak serum enzim tayini ile akut MI tanısının konulabilmesi için semptom başlangıcından 6-12 saat süre geçmesi gerekir. MI esnasında seruma geçen CK ve CK-MB seviyeleri infarktüs büyüklüğü ile doğru orantılıdır. CK-MB erken normale dönmesi nedeniyle reinfarktüs tanısında faydalı bir belirteçtir⁵⁵.

Laktat Dehidrogenaz

Laktat Dehidrogenaz (LDH) infarktüs sonrası 24-48 saat içinde yükselen bir enzimdir. İnfarktüsten sonra 8-14 gün içinde normale döner. Beş izoenzimi vardır. Kalp için spesifik olan LDH1 izoenzimidir. LDH1/LDH2 oranının >1 olması AMI için oldukça özgüldür. LDH'nin günümüzde tek kullanım alanı, geç dönemde başvuran, troponin pozitif ve CK değerleri normale inmiş vakalarda akut-subakut MI ayırımını yapmaktır⁵⁵.

Kardiyak Troponinler

Troponinler, kontraksiyon mekanizmasında düzenleyici proteinlerdir. Troponin I, T ve C olmak üzere üç formu vardır. Miyokard nekrozunun saptanmasında ve AMI tanısında troponin I ve T kullanılır. Nekrotik miyokardtten troponin T salınımı infarktüs başlangıcından 4-8 saat sonra başlar, 24-48 saatte pik yapar ve serumda 10 gün boyunca saptanabilir. Bu yüzden reinfarktüs tanısında faydalı bir belirteç değildir. Kardiyak troponin I kalbe spesifik kontraktıl bir proteindir ve akut MI tanısı için

mükemmel bir markerdir. Akut MI başlangıcından 3-6 saat sonra salınımı başlar ve 24-48 saatte pik yaparak MI'dan sonra 10 gün serumda yüksek kalabilir. Böbrek yetmezliği ve akut kas hasarında troponin T bir miktar serumda yükselebilirken, troponin I bu klinik durumlardan etkilenmez, ayırıcı tanıda faydalıdır. Kardiyak troponin ölçümlerinin özellikle NSTE-AKS ve yüksek riskli kararsız anjina pektoris hastalarının saptanmasında ve risk derecesinin belirlenmesinde önemli yerleri vardır⁵⁵. Troponinler değerlendirilirken yanlış pozitif sonuçların olabileceği unutulmamalıdır. Yanlış pozitiflik yapan durumlar akut romatizmal ateş, amiloidoz, kronik böbrek yetmezliği, miyokardit, perikardit, sepsis ve pulmoner embolidir⁵⁶. MI tanısında kullanılan biyobelirteçler tablo 3'te verilmiştir.

Tablo.3. AMI Tanısında Biyokimyasal Belirteçler⁵⁷

Belirteç	İlk değerlendirme zamanı (saat)	En yükseğe ulaşma süresi (saat)	Normal sınırlara dönme süresi
Miyogloblin	1-4	6	24 saat
Troponin I	6-12	24	5-10 gün
Troponin T	3-12	12-48	5-14 gün
CK-MB	2-12	24	48-72 saat
LDH	10	24-48	10-14 gün

Günümüzde gelişmiş tanı yöntemlerinin yanında son yıllarda AMI tanısı ile ilişkili olabileceği düşünülen diğer bir molekül miRNA'lardır^{5,6}.

mikroRNA (miRNA); Tarihçe

İnsan genomunun yaklaşık %97'si kodlanmayan DNA'dan oluşmaktadır. Genomik kodun büyük bir kısmı RNA'ya dönüştükten sonra asla proteine çevrilmezler. Proteine kodlanmayan RNA (non-protein-coding RNA, ncRNA) olarak adlandırılan bu grubun önemli işlevlerinin olduğu gösterilmiştir. Küçük (<400 nükleotid) ve büyük (>400 nükleotid) olarak iki gruba ayrılan ncRNA'lardan mikroRNA'lar (miRNA'lar), küçük (<400 nükleotid) ncRNA'lar içerisinde sınıflandırılmaktadırlar^{58,59}.

Napoli ve Stutje'nin genetik transformasyon çalışmalarında, petunya üzerindeki araştırmalar esnasında fark ettikleri, ancak yıllar sonra Jorgensen ve arkadaşlarının tanımladıkları "gen sessizleştirilmesi" miRNA keşfi için atılan en önemli adımlardandır. Çalışmalar sırasında, aktarılan transgenin sadece kendi kendisini değil, aynı zamanda endojenik genin ekspresyonunu da etkilediği görülmüş ve hem endojenik hem de transgenik mRNA'nın kaybını tanımlamak için co-supresyon terimi kullanılmıştır⁶⁰⁻⁶³.

İlk miRNA, Lee ve ark. tarafından 1993 yılında bulunmuştur⁶⁴ ve miRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır^{65,66}. 1993 yılında yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans*'ın gen içeriğini tarayan Lee ve ark. hiçbir protein kodlamayan lin-4 olarak adlandırdıkları genin, 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini bildirmişlerdir. O sıralar bir nematodun yapısal özelliği sanılan ve yaşam döngüsünün zamanlaması ile ilerlemesini kontrol ettiği düşünülen lin-4 keşfedilen ilk miRNA'dır^{64,67,68}. 2000 yılında Reinhart ve ark. *C. Elegans*'da, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen 22 nükleotid uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan farklı bir miRNA daha keşfetmişlerdir. İlk keşfedilen bu üyeler dolaşımda bulunan küçük, geçici RNA'lar olarak tanımlanmış ve miRNA olarak adlandırılmaları 2001 yılında gerçekleştirilmiştir. İnsanları da içine alan türler arasında let-7'nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olmasından dolayı korunduğu da gösterilmiştir^{67,69}.

Tanım

mikroRNA'lar, protein kodlamayan, tek sarmallı, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda olan RNA'lardır. Öncü miRNA'lar birkaç yüz ila bin nükleotit arasında değişen uzun RNA'lardır. RNA polimeraz II enzimi tarafından üretilen öncü miRNA'lar önce kısa miRNA-miRNA duplekslerine, sonunda da tek sarmallı olgun miRNA'ya dönüştürülürler. Olgun miRNA'lar tam ya da tama yakın olan mRNA sıralarına bağlanıp hedefindeki genlerin ekspresyonunu, transkripsiyon sonrasında ya translasyonu inhibe ederek ya da RNA degradasyonunu tetikleyerek inhibe ederler⁷⁰. miRNA'ların hedef mRNA'lara bağlanarak insan genlerinin %30-%90'ının ekspresyonlarını düzenlediği düşünülmektedir⁷¹.

miRNA'ların Adlandırılması Ve Sınıflandırılması

miRNA adlandırma sisteminde "mir" ön ekinden sonra ilgili türe ait kısaltma ve sayısal bir kodlama bulunmaktadır. Büyük harfle yazılmayan "mir-" pre-miRNA

formunu, büyük harfle yazılan “miR-” olgun miRNA formunu temsil etmektedir. Yaklaşık olarak eş dizilere sahip miRNA’ları adlandırmak için miR adından sonra son ek kullanılır. Örn: miR-123a dizisi ve miR-123b dizisi birbirlerine benzediği için a ve b şeklinde ayrılmışlardır. Normal şartlarda pre-miRNA’lar olgun miRNA’lar ile %100 aynıdır, fakat genomda farklı bölgelerde yerleşmişlerdir. Bu yerleşimi belirtmek için ayrıca bir ön ek ve sayısal adlandırmaya ihtiyaç vardır. Örneğin; hsa-mir-194-1 ve hsa-mir-194-2 pre-miRNA’ları aynı olgun miRNA ile sonuçlandıkları halde genomun farklı bölgelerinde bulunmaktadır. Türlerin kökenine göre ise hsa-miR-123 (hsa: Homo sapiens) şeklinde üçlü ön eklerle adlandırılırlar. İki olgun miRNA aynı pre-miRNA’nın karşılıklı kollarından köken alırsa ilgili dizinin ucuna göre -3p veya -5p son eki alır. Zincirlerin göreceli ekspresyon düzeyleri biliniyorsa, saç tokasının (hairpin) karşı kolunda miRNA’ya göre düşük düzeyde eksprese edilen miRNA’ya işaret etmek için arkasına yıldız işareti konulur. Örn; miR-123 ve miR-123* bir pre-miRNA saç tokasını paylaşırlar fakat ekspresyon farklılığından dolayı miR-123 hücrelerde daha fazla bulunur⁷²⁻⁷⁴.

miRNA’lar Nerede Kodlanırlar

miRNA’ların büyük çoğunluğu (%61) protein kodlayan genlerin intronlarında, daha az bir kısmı ise genlerin eksonlarında veya intergenik bölgelerde bulunmaktadır^{75,76}.

Protein kodlanan genlerin intron ve eksonlarında yerleşik miRNA genleri, aynı promotor aracılığıyla prekürsör mRNA (pre-mRNA) ile birlikte transkribe olmaktadır. mRNA ile korele dokuya özgü miRNA ekspresyon profilinin görülmesi, bu miRNA’ların pre-mRNA ile birlikte transkribe olmasından kaynaklanmaktadır. İntergenik bölgelerde yerleşik miRNA genlerinin transkripsiyonu ise kendi promotorları tarafından düzenlenmektedir⁷⁷⁻⁷⁹.

miRNA’ların Biyogenezi

miRNA’lar ya uzun birincil transkript (pri-miR) olarak transkript edilir ya da messenger RNA (mRNA)’ların intronları içinden meydana gelir⁸⁰. İnsan miRNA’larının çoğu protein kodlayan veya kodlamayan mRNA transkriptlerinin intronları içinde bulunur⁷⁷. Geriye kalan miRNA’lar ya genomdaki diğer transkriptlerden uzakta kodlayıcı olmayan mRNA genleri ekzonlarında, mRNA 3’UTR (untranslated region-

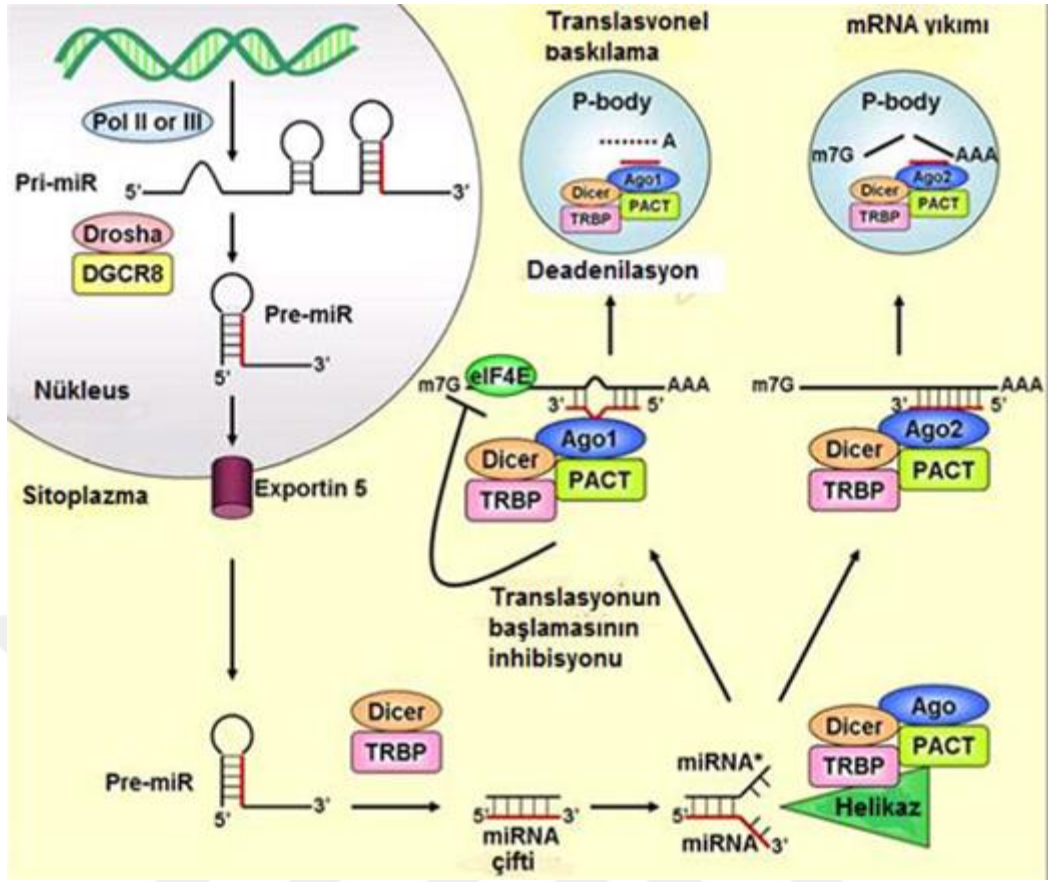
çevrilmemiş bölgede)'lerinde yer alır ya da 19'uncu kromozom üzerindeki küme dahil diğer miRNA genleri ile birlikte kümelenir^{77, 81-83}.

miRNA'lar birbirini takip eden üç adımı kapsayan süreç sonucunda oluşmaktadırlar. İlk olarak miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lar nükleus içinde prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara dönüştürülür. Son olarak olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir⁸⁰.

Olgunlaşmış miRNA'ların aktivitesi mRNA'ların içinde bir hedef sekansının tanınmasına bağlıdır. Bunlar genellikle 3'UTR bölgesinde bulunur, kısa ve genellikle eksik tamamlayıcıdır. Tipik olarak hedef alanlar, miR tohum sekansına (seed sequence) tamamlayıcı 6-7 nükleotid sekansı içerir, ardından poly A kuyruğu gelir. Bu kurallar miRNA hedeflerinin mRNA sekanslarından tahmin edilebilmesini sağlar⁸².

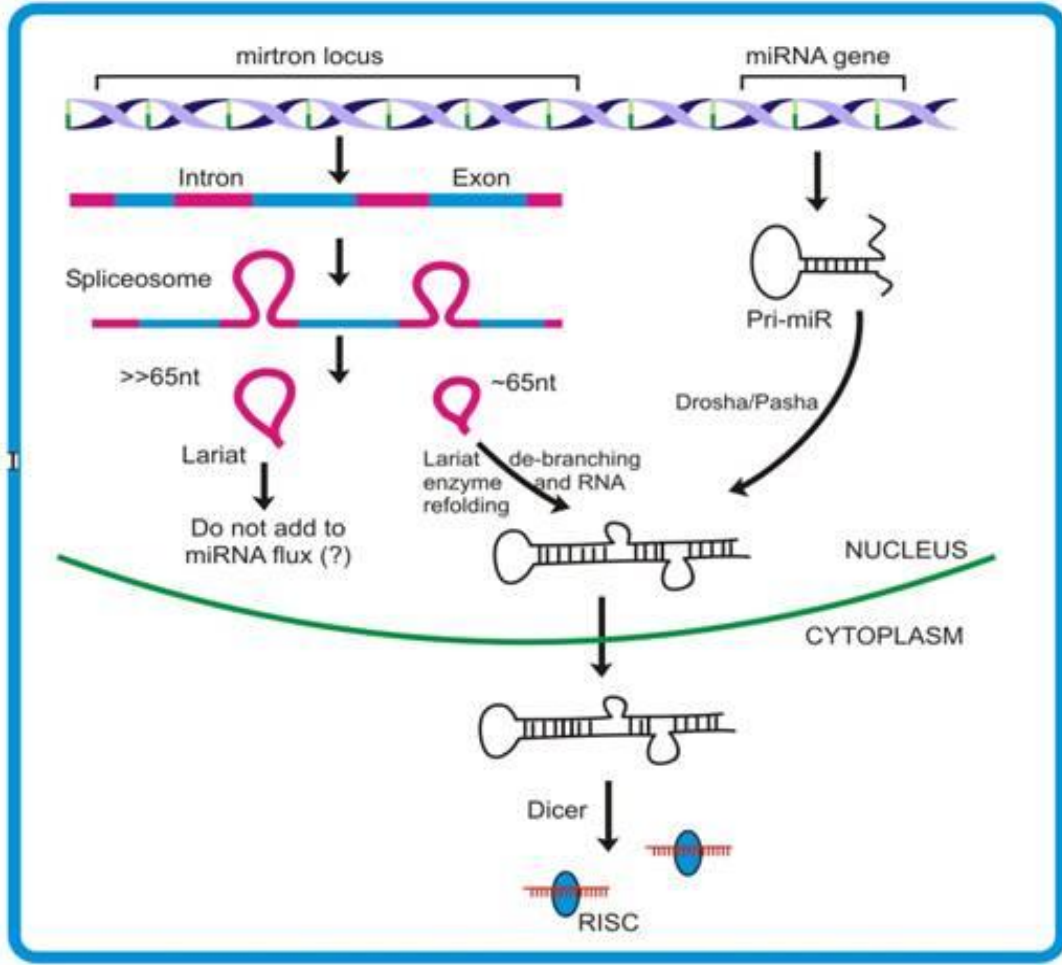
mikroRNA öncülleri (haberciler) genellikle protein kodlayan genler ile aynı şekilde ifade edilir. İlk önce RNA polimeraz II tarafından transkripte edilir ve sonra da poly-adenillenip pri-miRNA oluşturmak üzere kapatılır⁸². RNA polimeraz II enzimi tarafından primer transkript olarak genomik DNA'dan sentezlenen pri-miRNA (500-3000 baz), "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahip, sap-ilmik (saç tokası) yapısındadır. Çekirdekdeki pri-miRNA'nın yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülmesi, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü olan Pasha (DGCR8) tarafından gerçekleştirilir⁸⁴.

Çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha ile bir nükleaz olan Drosha'nın oluşturduğu yapı mikro işlemci kompleks (Microprocessor complex) olarak isimlendirilir ve bu kompleks tarafından çekirdekte bölünür. Saç tokası şeklindeki yapının iki kolu arasında ortaya çıkan eksik kendini tamamlayıcı kısa saç tokası şeklindeki döngüler pre- miRNA olarak adlandırılır⁸⁵⁻⁸⁷ (şekil 4).



Şekil.4. miRNA'ların Biyogenezi⁸⁷

Bazı miRNA'lar mirton adı verilen çok kısa intronlardan sentezlenirler. Mirton adı verilen çok kısa intronlardan oluşan miRNA'lar Drosha işlemini pre-miRNA şeklinde birbirine eklenmiş bütün intronları uzatarak atlar (bypass eder)⁸⁸ (Şekil 5).



Şekil 5. miRNA'ların Mirtron lokuslarından biyogenezi⁹¹

Bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı bir şekilde pre-miRNA molekülü sitoplazmaya taşınır^{80,89}. Bunun ardından, sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz tarafından kesilen pre-miRNA'lar, yine Dicer etkisiyle TAR RNA bağlayan protein (TRBP) veya polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aktive eden protein (PACT) ile etkileşimde bulunarak 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA:miRNA dubleksine çevrilir^{80,90}. Bu esnada Dicer etkisiyle, miRNA:miRNA çiftleri Argonaute1-4 oluşturarak, olgun RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır⁹¹.

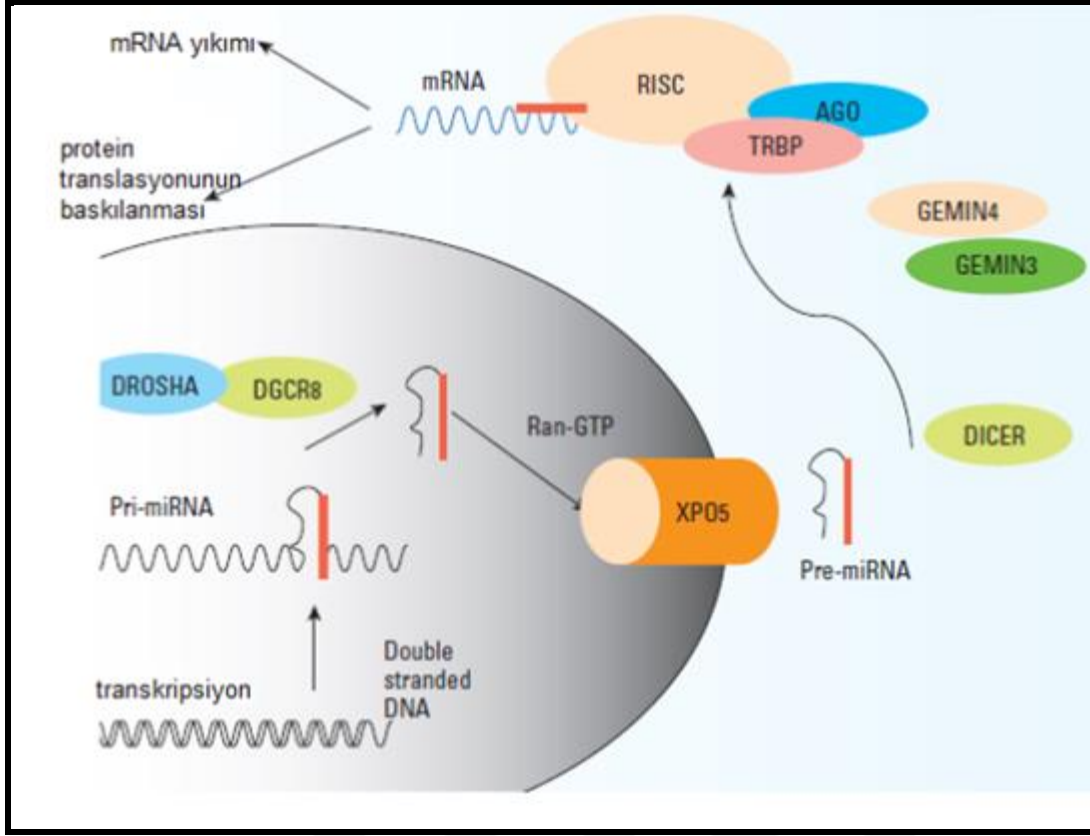
Pre-miRNA'nın sap-ilmliği Dicer tarafından kesildikten sonra, RISC kompleksine miRNA:miRNA dubleksinden sadece biri dahil olur. Kusursuz miRNA, mRNA tamamlayıcılığının Argonaute2 tarafından bölünmesine yol açar. Bu da

deneysel olarak önemli olmakla birlikte endojen memeli miRNA'larında oluşmadığı düşünülen small interfering RNA (siRNA) yollarıdır. Fakat genellikle bunun yerine eksik mRNA eşleşmeleri dönüşümünün aşağı yönlü regülasyonuna yol açar. Bunun gerçekleştiği mekanizmalar hala çok açık olmayıp bu dönüşümünün başlangıç veya uzatma süresi boyunca etkilendiğini destekleyen modeller vardır. Üçüncü bir olasılık ise farklı zamanlarda farklı mekanizmaların kullanıldığı en az bir sistemde gözlenen dikkat çekici bir durum olan mRNA sentezini işleyen düzenleyicinin aşağı yönlü regülasyonun hangi aşamada olacağını belirlemesidir⁹². Mekanizmanın tam doğası ne olursa olsun etkilenen mRNA'lar granüler sitoplazmik P-body'lerde RISC proteinleri ile beraber toplanır⁹³.

Bir RNAz olan ve RISC kompleksinin içinde yer alan Argonaute'ın etkisiyle iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. Bu ipliğe kılavuz iplik (guide strand) adı verilirken diğer iplik de anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır ve sindirilme işlemi RISC kompleksinin substratı olarak gerçekleşir. Aktif RISC kompleksine entegre olan miRNA'lar bu adımdan sonra, ya Argonaute proteinleri yardımıyla ya mRNA'nın yıkımına ya da pre veya posttranslasyonel basamakta protein translasyonunun inhibisyonuna sebep olurlar^{80,94}.

miRNA'ların Fonksiyonu

Günümüze kadar saptanmış olan miRNA'ların sadece çok az bir kısmının fonksiyonları aydınlatılmıştır. Hedef genlerin ekspresyonunu azaltan olgun miRNA'lar, protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. Kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahip miRNA'lar, RISC ile kompleks oluşturup baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlandıktan sonra protein translasyonunun inhibisyonuna ya da mRNA'nın yıkımına neden olurlar⁹⁵⁻⁹⁷ (Şekil 6).

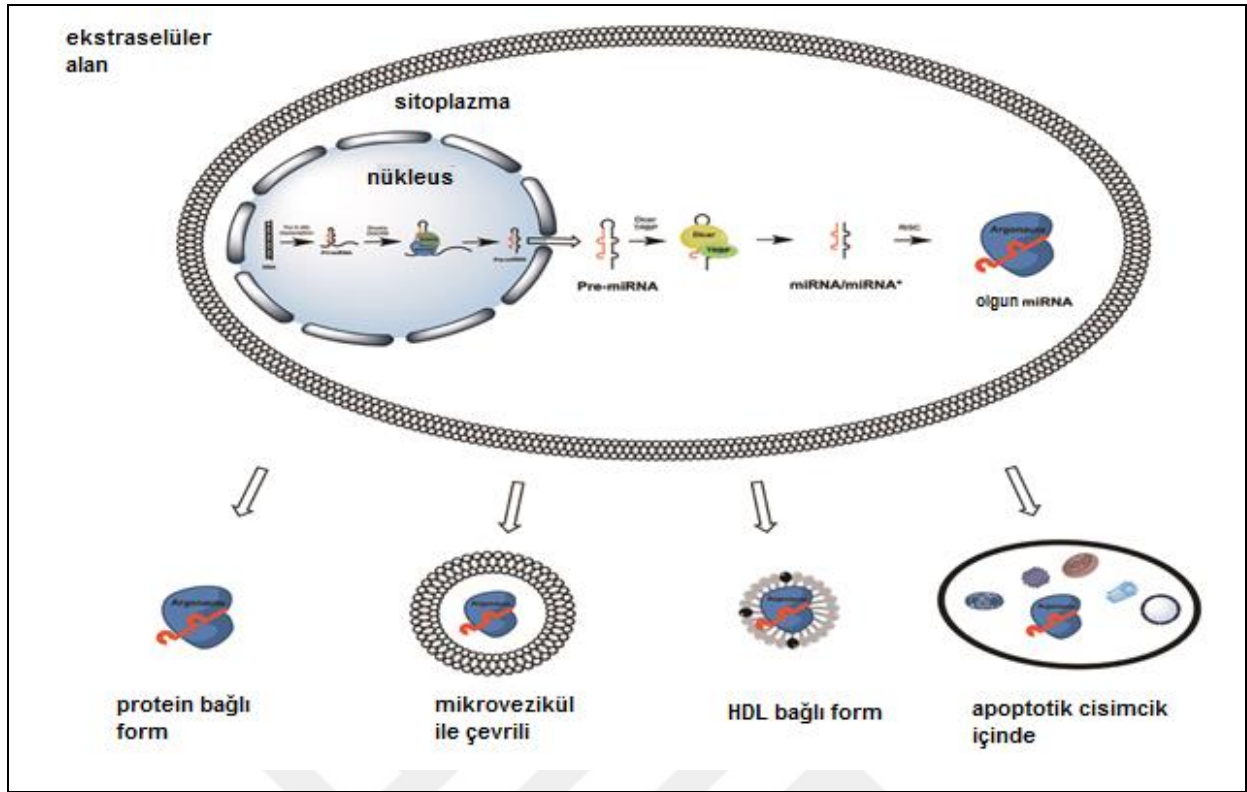


Şekil.6. miRNA fonksiyonları⁹⁵

mikroRNA, hedef mRNA'nın ORF (open reading frame-açık okuma çerçevesi) bölgesine veya hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanır ve bağlanma pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. 3'UTR bölgesine tam olarak bağlanmayan kusurlu, eksik komplementerlik gösterir ve translasyonun baskılanması ile sona ererken ORF bölgesi içine bağlanması kusursuz olan tam komplementerliği gösterir ve mRNA'nın Argonaute2 tarafından yıkımı ile sonuçlanır. Ayrıca, her bir miRNA'nın birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve her bir mRNA'nın da birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği gösterilmiştir⁹⁸.

miRNA'ların Hücre Dışına Salınım

Hücre içinde sentezlenen miRNA'lar başlıca dört yolla hücre dışına salınmaktadır. Bunlar 1) Ago-2 gibi RNA-bağlayıcı proteinlere bağlanarak, 2) Mikrovezikül şeklinde, 3) HDL bağlı form ve 4) Apoptotik cisimcikler halinde hücre dışına salınırlar⁹⁹ (şekil 7).



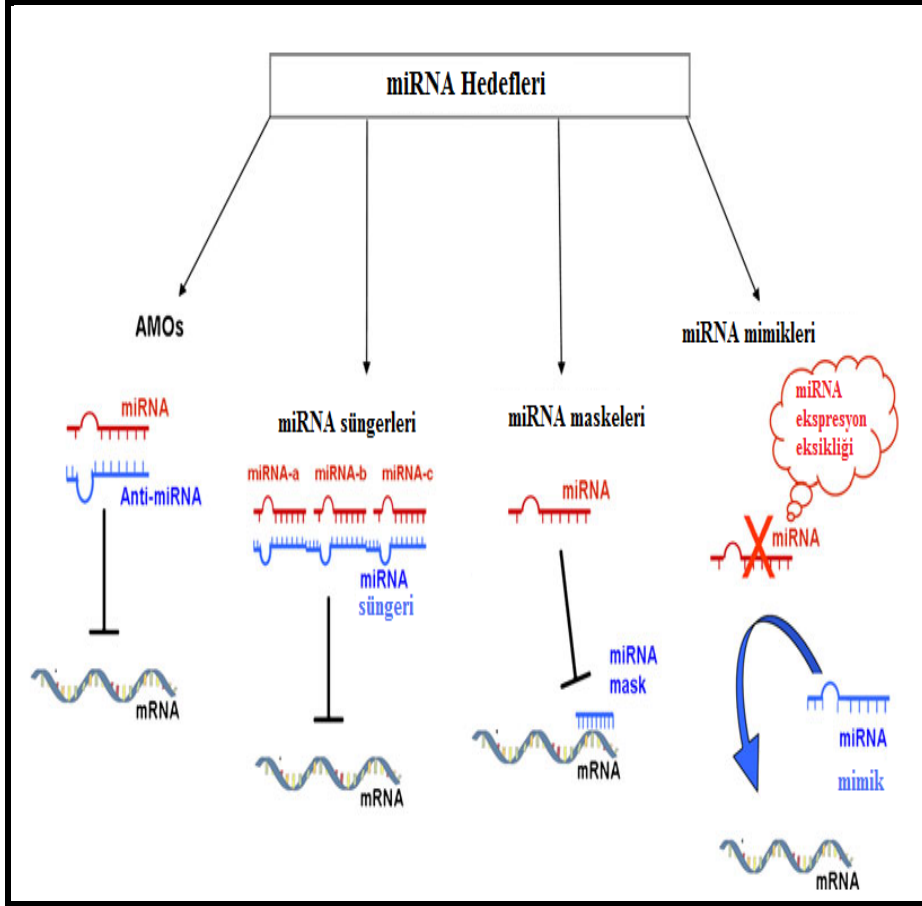
Şekil. 7. miRNA'ların hücre dışına salınımları⁹⁹.

miRNA Temelli Tedavi Seçenekleri

miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki anomaliler (mutasyon, delesyon ve amplifikasyonlar) sonucunda, ilişkili oldukları proteinlerin sentez düzenlenmesini yeterince yapamazlar. Böylece proteinlerin kritik işlevleri ile ilişkili olarak başta kanser, kardiyovasküler hastalıklar, musküler bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır¹⁰⁰. Keşfinden bugüne (1993-2016) devam eden çalışmaların sonucunda miRNA temelli tedavi günümüzde matür bir ilaç formuna dönüştürülmüştür. miRNA tabanlı tedavide iki yaklaşım vardır (Şekil 8).

1) **Antogomirler (AntimiR, blokmiR); miRNA antagonistleri;** miRNA'ları veya miRNA hedefi olan mRNA'ları etkisizleştirirler; a) Anti-miR oligonükleotidleri (AMOs) b) miRNA süngerleri c) miRNA maskeleri

2) **miRNA mimikleri (Replasman Tedavisi)**¹⁰¹



Şekil. 8. miRNA Temelli Tedavi Seçenekleri¹⁰¹

Anti-miR Oligonükleotid (AMO) Teknikleri

AMO'lar hedef miRNA'lara tamamen komplementer olarak yapay dizayn edilmiş oligonükleotidler olup hedef miRNA'ları bilinmeyen mekanizmalarla parçalayarak hedef miRNA'ların etkilerini ortadan kaldırmaktadır^{65,102}. Bu şekilde miRNA ekspresyonunu bozan stratejilerden fonksiyon kaybı (loss-of-function) sağlayarak güçlü ve miRNA'lara özgül inhibisyon sağlar. AMO'lar hücre içine girebilmek için kolesterol kalıntılarına bağlandığında 'antagomir' şeklinde adlandırılır. Antagomir'lerin istenmeyen miRNA'lara bağlanıp fare kalbinde in vivo miRNA ekspresyonunu susturma yeteneğinin olduğu bir çalışmada gösterilmiştir. Bugünlerde AMO, miRNA araştırmalarının vazgeçilmez bir parçası olup potansiyel tedavi ajanı olarak kullanımı yönünde umut vaat etmektedir¹⁰³.

miRNA Sünger Tekniği

Bu özel teknik Elbert ve ark. tarafından bulunmuş olup yenilikçi anti-miRNA yaklaşımı içermektedir. Bu yaklaşımda, ilgilenilen miRNA ailesinin kökü için birçok

sıralanmış bağlanma bölgesi içeren tek tür RNA parçacıkları üretilerek ilgilenilen miRNA ailesinin tüm üyeleri hedeflenmektedir. Bu yöntemin avantajı miRNA ve hedefi arasındaki ilişkinin kök ve tohum bölgesindeki (miRNA'nın 2-8.pozisyonunda) baz çiftleşmesine bağlı olmasıdır. Özel miRNA aile kökü için bağlanma bölgeleri tohum bölgesinde uygun komplementer baz eşleşmesi yaparken; 9-12 pozisyonlarında RNA-fonksiyon bozucu-tip kesimi ve sünger RNA'nın parçalanmasını engellemek için bulging yapar. Bu konuda yapılan çalışmalar bu özel sünger miRNA'ları kodlayan vektörlerin kültür hücrelerine transfekte edildiğinde konvansiyonel AMO'lar gibi güçlü bir şekilde miRNA hedeflerini inhibe ettiğini göstermiştir. AMO'lara göre üstünlüğü ise tek bir miRNA dizisi yerine tüm miRNA ailesinin sahip olduğu dizileri inhibe edebilmesidir¹⁰⁴.

miRNA-Maskeleme Antisens Oligonükleotid Teknikleri (miR-Mask ODN)

miR-Mask hedef mRNA'nın 3'UTR içerisindeki ilgilenilen endojen miRNA'ların bağlanma bölgesine tamamen antisens olacak şekilde dizayn edilmiştir. Hücre içine verilmesi sonrası miR-Mask endojen miRNA'dan daha yüksek affiniteyle hedef mRNA ile dupleks yapı oluşturur. Bu yolla miR-Mask hedef koruyucu şeklinde etki gösterip endojen miRNA'nın bağlanma bölgesine girişini bloke ederek bu miRNA'nın oluşturduğu inhibe edici etkileri ortadan kaldırır. İlk olarak bu teknik kardiyak pacemaker kanallarını kodlayan HCN2 ve HCN4 genleri üzerinde çalışılmış ve miR-Mask'ler miR-1 ve miR-133'ün inhibe edici etkilerini önlemiştir. Ayrıca bu miR-Mask'ler pacemaker kanallarının artmış protein ekspresyonunu ve artmış pacemaker kanal aktivitesini göstermiştir. Bu teknolojinin avantajı gene özgül miRNA-bozucu strateji sağlamasıdır. Sonuç olarak bu iki yöntem de belirli miRNA'ların hedef mRNA'nın protein translasyonu üzerine inhibe edici etkilerini gidererek artmış gen ekspresyonuna yol açmaktadır^{104,105}.

miRNA Taklit Edici Teknikler (miR-Mimic)

Bu teknolojiye, gene özgül tarzda hedef mRNA'nın kendine özgü dizilerine bağlanabilen sentetik, doğal olmayan nükleik asitler geliştirilmiş olup bunlar miRNA'ların yaptığı posttranskripsiyonel düzenleme fonksiyonlarına da yerine getirebilmektedir. miRNA etkisini gösterebilmek için hedef genin sadece 3'UTR bölgesindeki dizilere komplementer olup mRNA seviyesi üzerine minimal etki gösterip hedef geni posttranskripsiyonel seviyede inhibe eder. Bu teknoloji ilk kez

kardiyak pacemaker kanallarını kodlayan HCN2 ve HCN4 genleri üzerinde çalışılmış ve HCN2 veya HCN4 genlerinin özgül 3'UTR bölgesinde dizi uzantısı bulunup (miRNA'ların etkisini gösterebileceği kadar uzun) bu bölgeye komplementer 5'ucunda 8 nükleotid ve 3'ucunda 7 nükleotid bulunduran ve 22 nükleotidlik "miR-Mimics" dizayn edilmiştir. Bu miR Mimics'lerin HCN kanal proteinlerini inhibe ettiği ve bunu takiben de mRNA seviyeleri üzerinde minimal etki göstererek pacemaker aktivitesini ve kalp hızını baskıladığı gösterilmiştir¹⁰⁵.

Bu çalışmada, daha önceki araştırmalarda AMI tanısı almış hastalarda ekspresyon değişimleri açısından ortak fikir oluşturmuş miRNA'ların, NSTEMİ ve STEMİ tanısı almış olan hastalardaki ekspresyon düzeylerini tespit etmeyi hedefledik. Bunlar; hsa-miR-1, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-150, hsa-miR208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR374a-5p ve hsa-miR499a-5p'dir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'na Akut Miyokard İnfarktüsü tanısı ile başvuran 25 ST yükselmeli (Erkek: 20, Kadın: 5, Yaş ort: 59,9±11,0) ve 25 ST yükselmez (Erkek: 22, Kadın: 3, Yaş ort: 64,24±11,1) hastalar dahil edildi. Kontrol grubuna (Erkek: 14, Kadın: 6, Yaş ort: 49,6±7,3) ise herhangi bir sistemik hastalığı olmayan tamamen sağlıklı 20 kişi dahil edildi.

Hasta ve kontrol grubunun, demografik özellikleri, aile öyküleri, özgeçmişleri kaydedildi.

Bu tez çalışmasına, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Etik Kurul Başkanlığı'nın 28.08.2014 tarihli ve 2014/203 sayılı kararı ile 'Etik Kurul Onayı' alındıktan sonra başlandı. Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubundaki bireylerin kendilerine hastalıkla ilgili bilgi verildi ve yapılacak işlemler için onay alındı.

Kontrol ve hasta grubundaki hastalardan miRNA analizi için %7,5 EDTA'lı tüplere 5 ml tam kan örnekleri alındı.

İşlemlerde ortak kullanılan sarf malzemeler:

- Pipet ucu 1-10 µL (Katalog No: DFL10, Gilson)
- Pipet ucu 2-30 µL (Katalog No: DF30, Gilson)
- Pipet ucu 10-100 µL (Katalog No: DF100, Gilson)
- Pipet ucu 20-200 µL (Katalog No: DF200, Gilson)
- Pipet ucu 100-1000 µL (Katalog No: DF1000, Gilson)
- 0.2 mL Thermo-Strip (8'li strip tüp, Thermo Scientific, UK)
- 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpü (DNaz, RNaz sız)
- 96 Well PCR Plate (Katalog No: 1402-9400, USA Scientific)
- PCR Plate Film (Katalog No: 2921-7800, USA Scientific)

İşlemlerde Ortak Kullanılan Cihazlar:

- 8 kanallı pipet 1-20 µL (Gilson)
- 8 kanallı pipet 20-200 µL (Gilson)
- Pipet 2-20 µL (Gilson)

Pipet 10-100 µL (Gilson)

Pipet 20-200 µL (Gilson)

Pipet 100-1000 µL (Gilson)

Santrifüj (Nüve NF 800, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat Ve Ticaret AŞ, Ankara, Türkiye)

Santrifüj (Sigma 1-15 Microfuge, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Postfach 1713, Germany)

Santrifüj (Sigma 1-14 Microfuge, SN: 141318, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Postfach 1713, Germany)

Derin dondurucu (-80° C , Lab -85° C, Elcold)

Derin dondurucu (-20° C, Uğur Soğutma Makinaları San. Ve Tic. A.Ş.)

Buzdolabı (+ 4° C, Electrolux)

Plate Karıştırıcısı (PKT Smart Mixer, Multi Shaker, JSH-03, SN: JMC-JSH03-1005, PhileKorea, Korea)

Plate santrifüjü (PKT Mini Multi-well plate centrifuge, JCW48, SN: PKT-JCW48-1057, PhileKorea, Korea)

Termal cycler (Gene-Pro Thermal Cycler, B384G, SN: BYQ606002E-060, Korea)

miRNA Analizi:

1. Plazma eldesi:

Çalışma gruplarından % 7,5 EDTA'lı tüplere alınan 5 ml'lik kan örnekleri yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılarak plazmaları ayrıldı.

1. Tüpler 2000 g'de 15 dakika santrifüj edildi.

2. Santrifüj işlemi sonunda tüpler dikkatlice santrifüjden çıkartıldı.

3. Plazmanın en üst kısmından 1000 µl olacak şekilde plazma toplandı.

4. Toplanan 1000 µl lik plazma 2000 g de 5 dakika santrifüj edildi ve plazmanın en üst kısmından alttaki süpernatana dokunmadan pipet ile (DNase, RNase Free, filtreli pipet uçları kullanılarak) 200 µl temiz bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Mikrosantrifüj tüpleri hastaya ait barkod etiketi ile etiketlendi.

5. Bu şekilde ayrılan plazma örnekleri -80°C'de derin dondurucuda saklandı.

miRNA izolasyonu:

miRNA'lar, plazmadan miRNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) ile izole edildi.

Protokol:

1- Plazma örnekleri en az 5 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve 150 µl'lik kısım temiz bir mikrosantrifüj tüpüne (DNase, RNase Free) alındı.

2- Örnekler üzerine 312 µl Binding Buffer ve 200 µl Binding Enhancer eklendi ve karıştırıldı.

3- Karıştırılan örnekler filtrelili tüp + toplama kabına aktarıldı. 13000 g'de 1 dakika sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.

4- Temiz toplama kaplarına alınan filtrelili tüplere 500 µl Wash Buffer eklendi. 13000 g'de 30 sn. sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.

5- Temiz toplama kaplarına alınan filtrelili tüplere 300 µl Wash Buffer eklendi. 13000 g'de önce 30 saniye sonra 1 dakika sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.

6- Filtrelili tüpler temiz bir mikrosantrifüj tüpüne (DNase, RNase Free) alındı ve 50 µl Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilen örnekler 13000 g'de 1 dakika sanrifüj edildi.

7- Elde edilen total RNA -80°C'de derin dondurucuda saklandı

2. cDNA Hazırlanması:

Aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım 70 örneğin cDNA reaksiyonu için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir).

5x Reaction Buffer 230 µl

Enzyme mix 115 µl

TOPLAM 345 µl

Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 41 er µl olarak transfer edilir. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 3 er µl alınarak temiz bir 96 lık Plate'in tüm kuyularına pipetlendi.

RNA örnekleri de her kuyuya, yukarıda transferi yapılan karışımların üzerine 7 şer µl olmak üzere pipetlendi. Plate film ile kaplandı, plate karıştırıcıda elle bastırılarak 10 saniye karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi ve Plate Thermal Cycler'a konularak aşağıdaki program çalıştırıldı.

42 ^o C	60 dakika
95 ^o C	5 dakika
4 ^o C	∞

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklendi (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir) ve plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi. Preamplifikasyon hemen gerçekleştirilmeyecekse -20° C de saklandı.

PreAmplifikasyon Hazırlanması:

Preamplifikasyon primer karışımı (Pool Primer Mix) her plate için bir kez aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Primer plate'i plate santrifüjünde 2 dakika santrifüj edildi. Üzerindeki film açıldı ve her kuyuya 9 µl 1x TE Buffer ya da 1x DNA Suspension Buffer ya da DNase, RNase Free su eklendi. Plate karıştırıcıda 3 dakika 2000 rpm de karıştırıldı. Plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edildi. 4° C de 30 dakika bekletildi ve yukarıdaki karıştırma ve santrifüj işlemleri tekrarlandı.

Bir rezervuarın içerisine bu primer kuyularından 4.5 er µl primer konularak hepsi birbirine karıştırıldı. Bu karışım halindeki primerlerin üzerine 54 µl 1x TE Buffer ya da 1x DNA Suspension Buffer ya da DNase, RNase Free su eklendi. İyice karıştırıldı ve 150 şer µl olacak şekilde 3 ayrı SafeLock Eppendorf tüpüne konularak uygun şekilde etiketlendi. Bu tüplerin her biri 1 adet 96 lık örneğin preamplifikasyonu için yeterlidir.

Plate içerisinde kalan primerler plate film ile kaplanarak aşağıdaki Dynamic Array hazırlanması kısmına kadar 4° C de ya da -20° C de saklandı. cDNA plate'i bir plate taşıyıcı üzerine konuldu (plate'in kaymaması ve kırıdamaması için gereklidir). Film açıldı. Bir rezervuara 5 mL kadar DNase, RNase-free su konuldu. Plate'in her kuyusuna 40 µl bu sudan eklendi. Yeni bir film ile plate kaplandı, plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi.

Preamplifikasyon deneyi için aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım 96 örneğin PreAmplifikasyon reaksiyonu için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir)

TaqMan PreAmp Master Mix (Life Technologies P/N 4361128)	300 µl
Pool Primer Mix	150 µl
TOPLAM	450 µl

Bu karışım bir 8 li strip tütün tüm kuyularına 54 er µl olarak transfer edilir. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 3.75 er µl alınarak temiz bir 384 lük Plate'in tüm ¼ üne pipetlendi.

Sulandırılmış olan cDNA örneklerinden her kuyuya 1.25 er µl olmak üzere pipetlendi. Plate, film ile kaplandı, plate karıştırıcıda 3000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edilirdi ve Plate 384 lük Thermal Cyclus da eğer aşağıdaki PreAmp Protokolü çalıştırıldı.

PreAmp Protokolü

95°C	10 dakika	başlangıç denatürasyon
94 C	15 saniye	15 döngü
60 C	4 dakika	15 döngü
4° C	∞	

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklendi (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir). Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi, film açıldı. Her kuyudan 2 şer µl alınarak yeni bir 384 lük plate in kuyularına transfer edildi. Her kuyuya 8 er µl DNase, RNase free su eklendi. Yeni bir film ile plate kaplandı, plate karıştırıcıda 3000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi.

Dynamic Array Hazırlanması:

Bu aşama da 6 ayrı adım vardır;

1. Dynamic Array'in PRIME edilmesi,
2. Assay Plate'inin hazırlanması,
3. Örneklerin hazırlanması,
4. Dynamic Array'e pipetlemelerin yapılması,
5. IFC Controller da Dynamic Array'in Load edilmesi,
6. Dynamic Array'in BioMark da çalışılması

1. Dynamic Array'in PRIME edilmesi:

Bir adet Dynamic Array'e kontrol sıvılar enjekte edildi ve Dynamic Array IFC Controller da PRIME edildi. Bu işlem tam 20 dakika sürdü. PRIME işlemi devam ederken aşağıdaki aşamaya geçildi.

2. Assay Plate'inin Hazırlanması:

Pool Primer Mix hazırlandıktan sonra plate de kalan primerler oda sıcaklığına getirildi. Aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım bir adet Assay Plate için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir).

2X Assay Loading Reagent	1260 µl
DNase, RNase Free su	630 µl
TOPLAM	1890 µl

Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 230 ar µl olarak transfer edildi. Assay plate in her bir kuyusuna bu karışımdan 13.5 er µl pipetlendi.

Assay Plate film ile kaplandı. Plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi.

Hazırlanan bu karışım Dynamic Array lere pipetlemeye hazırdır ve 3 adet Dynamic Array için yeterlidir. Kullanılmayan primer plate inin hemen -20° C de saklanması gerekir.

3. Örneklerin Hazırlanması:

Aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım bir set (96 örnek) için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir).

2x TaqMan Gene Expression Master Mix	360 µl
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	36 µl
20x EvaGreen	36 µl
RNase-free water	108 µl
TOPLAM	540 µl

Bu karışım bir 96 lık plate in ilk kolonunun 8 kuyusuna 65 er µl olarak transfer edildi. Bu karışımdan 4.5 er µl temiz bir 96 lık plağın tüm kuyularına pipetlendi. Sulandırılmış olan preamplifiye ürünlerin üzerindeki film açıldı. Her bir preamplifiye örnekten 1.5 er µl bu plate' e transfer edildi. Plate yeni bir film ile kaplandı. Plate,

plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de 30 saniye santrifüj edildi.

4. Dynamic Array'e Pipetlemelerin Yapılması:

Assay pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12.5 µl) de şu program yapıldı. Aspirate 4.75 µl, Dispense 4.50 µl. Tüm kuyularda ki Assayler bu şekilde Dynamic Array e transfer edildi.

Örnek pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12.5 µl) de Assay için yapılan program kullanıldı.

Tüm kuyularda ki Örnekler bu şekilde Dynamic Array e transfer edildi.

5. IFC Controller da Dynamic Array'in Load edilmesi:

Dynamic Array IFC Controller'a yerleştirildi ve LOAD Seçeneği seçilerek LOAD işlemi başlatıldı. Bu işlemi başlattıktan sonra BioMark Data Collection yazılımı başlatıldı ve "Double Click to Turn Lamp On" kısmına çift tıklanarak BioMark'ın lambası çalıştırıldı. Lambanın ısınması 20 dakika sürdü.

6. Dynamic Array'in BioMark da çalışılması:

Dynamic Array IFC Controller'den alındı. Dynamic Array altındaki mavi filmin uzaklaştırıldığından emin olundu. Chip yüzeyinin temiz olup olmadığı kontrol edildi. Dynamic Array BioMark'a barcode kısmı dışarı bakacak şekilde yerleştirdi.

BioMark Data Collection yazılımı yardımı ile Dynamic Array çalıştırıldı. Verilerin kaydedileceği yer ve Dosya adı seçildikten sonra diğer sayfa da. "Gene Expression" seçildi. Passive Reference Dye olarak "ROX" seçildi. "Probe Type" kısmında "EvaGreen" seçildi.

Sonraki ekranda Protokoller arasından "Exiqon miRNA Protokol" seçildi ve Program başlatıldı.

İstatistiksel Analiz

Kategorik değişkenler sayı ve yüzde cinsinden, sürekli değişken ise ortalama±standart sapma cinsinden özetlenmiştir. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla ki kare testinden yararlanılmıştır. Sürekli değişken bakımından iki grup karşılaştırılmasında Independent sample t testinden yararlanılmıştır. Analizler MedCalc v.10.3.0 ile yapılmıştır. miRNA analizlerinde student t testi kullanılmıştır. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



BULGULAR

STEMI, NSEMI ve Kontrol Gruplarına Ait Demografik Bulgular

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'na Akut Miyokard İnfarktüsü tanısı ile başvuran 25 ST yükselmeli ve 25 ST yükselmesiz hastalar ile herhangi bir sistemik hastalığı olmayan sağlıklı 20 kişi kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tüm gruplara ait demografik özellikler Tablo 4'te, STEMI, NSTEMI ve kontrol gruplarına ait ayrı ayrı demografik özellikler Tablo 5'te, STEMI ve NSTMI hasta gruplarına ait demografik özellikler ise tablo 6'te verilmiştir.

Tablo. 4. Çalışmaya dahil edilen tüm gruplara ait demografik özellikler

Cinsiyet		n	%
	Kadın	14	20,0
Erkek	56	80,0	
Dm	Yok	53	75,7
	Var	17	24,3
Ht	Yok	49	70,0
	Var	21	30,0
Hiperlipidemi	Yok	63	90,0
	Var	7	10,0
Kalp hastalığı	Yok	56	80,0
	Var	14	20,0
Sigara	Yok	42	60,0
	Var	28	40,0
Alkol	Yok	61	87,1
	Var	9	12,9
ST elevasyon	Yok	25	35,7
	Var	25	35,7
	Kontrol	20	28,6

Tablo. 5. STEMI, NSTEMI ve kontrol gruplarına ait demografik özellikler

		Kontrol Grubu	STEMI Grubu	NSTEMI Grubu
Yaş		49,60±7,3	58,90±11,0	64,24±11,1
		n (%)	n (%)	n (%)
Cinsiyet	Kadın	6 (30)	5 (20)	3 (12)
	Erkek	14 (70)	20 (80)	22 (88)
Diyabet	Var	0 (0)	8 (32)	9 (36)
	Yok	20 (100)	17 (68)	16 (64)
Kalp Hastalığı	Var	0 (0)	6 (24)	8 (32)
	Yok	20 (100)	19 (76)	17 (68)
Hipertansiyon	Var	0 (0)	12 (48)	9 (36)
	Yok	20 (100)	13 (52)	16 (64)
Hiperlipidemi	Var	0 (0)	5 (20)	2 (8)
	Yok	20 (100)	20 (80)	23 (92)
Sigara	Var	0 (0)	17 (68)	11 (44)
	Yok	20 (100)	8 (32)	14 (56)
Alkol	Var	0 (0)	7 (28)	2 (8)
	Yok	20 (100)	18 (72)	23 (92)

Tablo 6. STEMI ve NSTEMI hasta gruplarına ait demografik özellikler

		NSTEMI Grubu	STEMI Grubu	P
		n(%)	n(%)	
Cinsiyet	Kadın	3(12.0)	5(20.0)	0.702
	Erkek	22(88.0)	20(80.0)	
Diyabet	Yok	16(64.0)	17(68.0)	0.765
	Var	9(36.0)	8(32.0)	
Hipertansiyon	Yok	16(64.0)	13(52.0)	0.390
	Var	9(36.0)	12(48.0)	
Hiperlipidemi	Yok	23(92.0)	20(80.0)	0.417
	Var	2(8.0)	5(20.0)	
Kalp hastalığı	Yok	17(68.0)	19(76.0)	0.529
	Var	8(32.0)	6(24.0)	
Sigara	Yok	14(56.0)	8(32.0)	0.087
	Var	11(44.0)	17(68.0)	
Alkol	Yok	23(92.0)	18(72.0)	0.138
	Var	2(8.0)	7(28.0)	

STEMI grubu hastaların yaş ortalaması $59,90 \pm 11,0$, NSTEMI grubu hastaların yaş ortalaması $64,24 \pm 11,1$ iken kontrol grubunun yaş ortalaması $49,60 \pm 7,3$ olarak saptandı (Tablo 5).

Kontrol grubuna dahil edilen 20 kişinin 6'sı (30%) kadın, 14'ü (70%) erkek idi. Kontrol grubundaki hiçbir kişide diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara ve alkol kullanımı bulunmamaktaydı (Tablo 5,6).

STEMI grubu hastaların 5'i (20%) kadın, 20'si (80%) erkek idi. Bu hastalardan 8'inde (32%) diyabet, 6'sında (24%) kalp hastalığı, 12'sinde (48) hipertansiyon, 5'inde (20) hiperlipidemi bulunmaktaydı. Bu hastalardan 17'si (68) sigara ve 7'si (28) alkol kullanmaktaydı (Tablo 5,6).

NSTEMI grubu hastaların 3'ü (12%) kadın, 22'si (88%) erkek idi. Bu hastalardan 9'unda (36%) diyabet, 8'inde (32%) kalp hastalığı, 9'unda (36) hipertansiyon, 2'sinde (8) hiperlipidemi bulunmaktaydı. Bu hastalardan 11'i (44) sigara ve 2'si (8) alkol kullanmaktaydı (Tablo 5,6).

NSTEMI ve STEMI grubu hastalar arasında cinsiyet, diyabet, hipertansiyon, hiperlipedemi, kalp hastalığı, sigara ve alkol parametreleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 6).

STEMI, NSTEMI ve Kontrol Gruplarına Ait miRNA Ekspresyon Düzeylerine Ait Bulgular

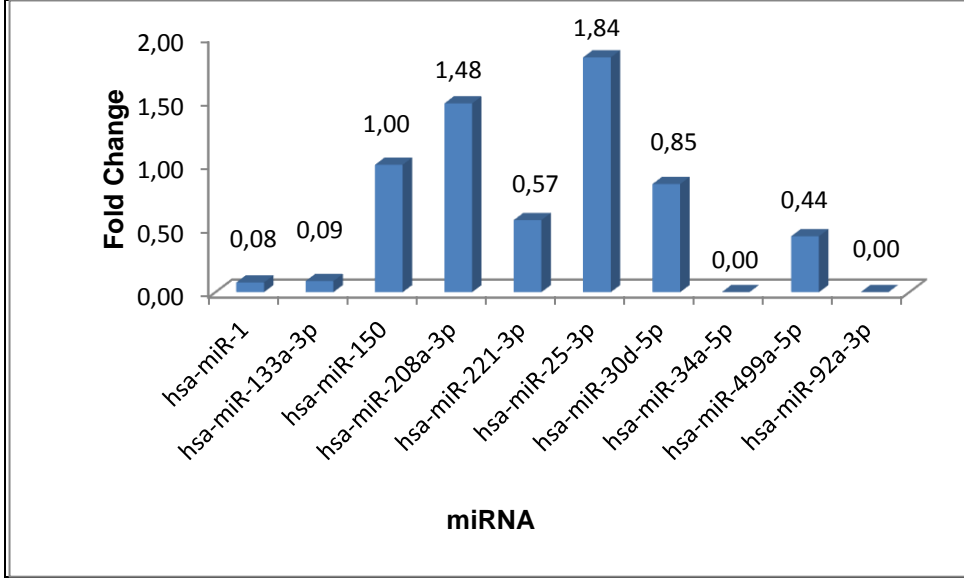
Bu çalışmada, STEMI, NSTEMI ve kontrol gruplarında, daha önceki araştırmalarda AMI tanısı almış hastalarda ekspresyon değerleri açısından ortak fikir oluşturmuş hsa-miR-1, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-150, hsa-miR208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-374a-5p, hsa-miR499a-5p ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır.

NSTEMI ve Kontrol Gruplarına Ait miRNA Ekspresyon Düzeylerine Ait Bulgular

Çalışmaya dahil edilen NSTEMI hasta grubu ile kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri Tablo 7 ve Şekil 8 'de verilmiştir.

Tablo.7. NSTEMI ve kontrol gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	Fold Change	p	Delta c_q değerleri
hsa-miR-1	0.00	>0.05	19.17
hsa-miR-133a-3p	0.08	>0.05	3.72
hsa-miR-150	0.09	0.19	3.52
hsa-miR-208a-3p	1.00	>0.05	0.01
hsa-miR-221-3p	1.48	0.80	- 0.56
hsa-miR-25-3p	0,57	0.88	0.82
hsa-miR-30d-5p	1.84	0.49	- 0.88
hsa-miR-34a-5p	0.85	0.18	0.24
hsa-miR-499a-5p	0.00	>0.05	19.5
hsa-miR-92a-3p	0.44	0.98	1.19
hsa-miR-374a-5p	0.00	>0.05	21.36



Şekil.9. NSTEMI ve kontrol gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri

NSTEMI hasta grubu ve kontrol grubundaki hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-30d-5p miRNA'ların fold change hesabı 1'in üzerindeydi, fakat kontrol grubu ile NSTEMI hastalarının miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

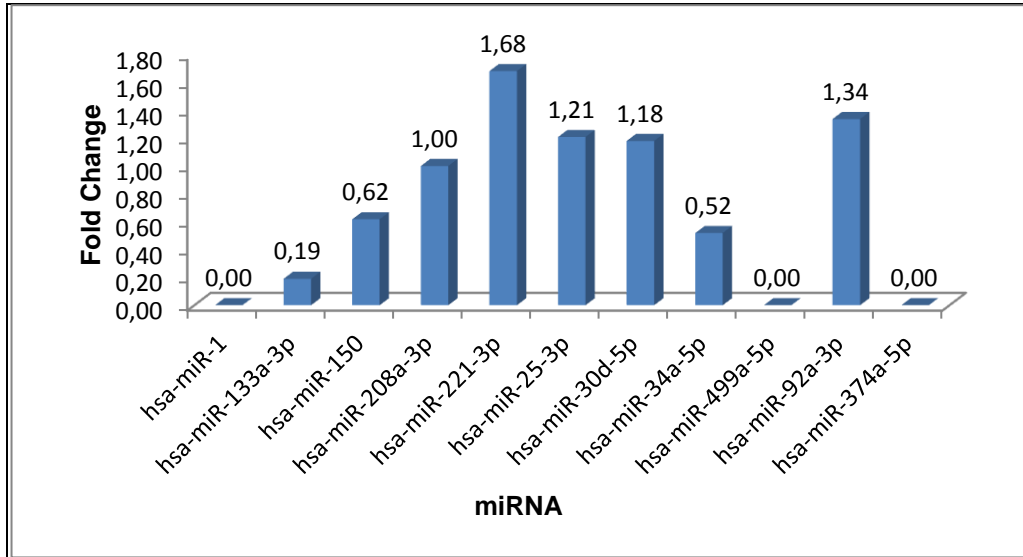
STEMI ve Kontrol Gruplarına Ait miRNA Ekspresyon Düzeylerine Ait Bulgular

Çalışmaya dahil edilen STEMI hasta grubu ile kontrol grubu miRNA ekspresyon düzeyleri Tablo 8 ve Şekil 10'da verilmiştir.

Tablo.8. STEMI ve kontrol gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	Fold Change	p	Delta Cq değerleri
hsa-miR-1	0.00	>0.05	19.86
hsa-miR-133a-3p	0.19	>0.05	2.40
hsa-miR-150	0.62	0.51	0.70
hsa-miR-208a-3p	1.00	>0.05	0.01
hsa-miR-221-3p	1.68	0.30	- 0.75
hsa-miR-25-3p	1.21	0.74	- 0.27

hsa-miR-30d-5p	1.18	0.77	- 0.24
hsa-miR-34a-5p	0.52	0.59	0.95
hsa-miR-499a-5p	0.00	>0.05	20.78
hsa-miR-92a-3p	1.34	0.68	- 0.42
hsa-miR-374a-5p	0.00	>0.05	21.25



Şekil.10. NSTEMI ve kontrol gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri

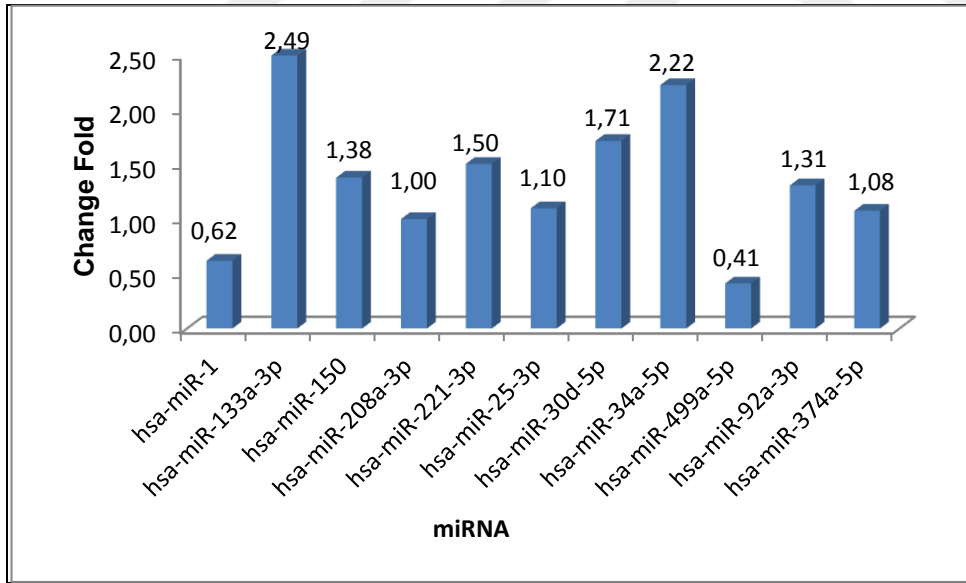
STEMI hastaları ve kontrol grubundaki hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-92a-3p miRNA'ların fold change hesabı 1'in üzerindeydi, fakat kontrol grubu ile STEMI hastalarının miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

STEMI ve NSTEMI Gruplarına Ait miRNA Ekspresyon Düzeylerine Ait Bulgular

Çalışmaya dahil edilen NSTEMI ile STEMI hasta gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri Tablo 9 ve Şekil 11'de verilmiştir.

Tablo.9. NSTEMI ve STEMI hasta gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri

miRNA	Fold Change	p	Delta Cq değerleri
hsa-miR-1	0.62	>0.05	0.69
hsa-miR-133a-3p	2.49	>0.05	- 1.32
hsa-miR-150	1.38	0.52	- 0.46
hsa-miR-208a-3p	1.00	>0.05	0.01
hsa-miR-221-3p	1.50	0.27	- 0.59
hsa-miR-25-3p	1.10	0.82	- 0.13
hsa-miR-30d-5p	1.71	0.18	- 0.78
hsa-miR-34a-5p	2.22	0.32	- 1.15
hsa-miR-499a-5p	0.41	>0.05	1.28
hsa-miR-92a-3p	1.31	0.58	- 0.39
hsa-miR-374a-5p	1.08	>0.05	- 0.11



Şekil.11. NSTEMI ve STEMI hasta gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri

NSTEMI ve STEMI hasta gruplarında hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-150, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-374a-5p miRNA'ların fold change hesabı 1'in üzerindeydi, fakat iki hasta grubunun miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

TARTIŞMA

Koroner arterlerin ateroskleroza ile karakterize koroner arter hastalığı iskemik kalp hastalıklarının büyük çoğunluğundan sorumludur. Koroner arter hastalığının en sık semptomu göğüs ağrısıdır ve ABD'de her yıl 5 milyon kişi göğüs ağrısı ile acil servislere başvurmaktadır. Bu rakam acil servise başvuruların %5'ini oluşturmaktadır. Acil servise göğüs ağrısı ile başvuran hastaların yaklaşık %15'ine AMI tanısı, %25-30'una da USAP tanısı konmaktadır. İskemik kalp hastalığı ABD'de yılda 500000 ölüm hızı ile erişkinlerdeki en sık ölüm sebebidir . Gerçek insidansı ile ilgili yeterli ve kesin bir bilgi olmamakla birlikte ABD'de yıllık 1680000 hasta Akut Koroner Sendrom (AKS) tanısı ile hospitalize edilmektedir. Akut koroner sendromlar gelişmiş ülkelerde olduğu kadar gelişmekte olan ülkelerde de ciddi bir sağlık problemi olmaya giderek artan bir hızda devam etmektedir³.

STEMI veya NSTEMI'li hastalarda mortalite son derece yüksek olup bu hastaların yaklaşık 1/3'ü ilk bir saat içinde kaybedilmektedir. Hastanedeki ölümlerin ise 2/3'ü ilk 24 saat içindedir. NSTEMI' da hastanede mortalite %10 iken, STEMI' da %20'dir. Bu hastaların ancak %30-50'sine AMI tanısı konulabilmektedir. AMI sonrası hayatta kalanlar, kalp yetmezliği, angina pectoris ve miyokard hasarına bağlı fonksiyonel kısıtlamalar nedeniyle kronik debilite riski ile karşı karşıyadır. Beklenmedik hastane dışı ölümlerin yarısı AKS'a bağlı gelişen ani kardiyak ölümlerden kaynaklanmaktadır^{10,11}.

Akut koroner sendromlara yaklaşımda ilk basamak doğru tanının hızlı bir şekilde konulabilmesidir. Hızlı ve doğru tanı konulması sonrasında hastalar ne kadar erken dönemde tedavi alabilirlerse aldıkları tedaviden o kadar faydalanırlar. Tanı konulması esnasında hastanın göğüs ağrısı sorgulanmakta, elektrokardiyografik değişiklikler incelenmekte ve kardiyak biyobelirteçlerin serum düzeyleri tayin edilmektedir. Kardiyak biyobelirteçlerden Troponin T ve I (cTn'ler) miyokardiyal hasarı gösterir ve günümüzde akut koroner sendromların tanısında kullanılan altın standart testlerdir. Her ne kadar cTn'lerin akut koroner sendrom tanısındaki yeri tartışılmaz ise de, görece geç dönemde yükselme göstermesi ve başka birçok klinik durumda da artış göstermesi kısıtlılıklarıdır²⁹. Akut koroner sendrom hastaların tanısına yönelik birçok yeni kardiyak biyobelirteç klinik olarak çalışılmıştır ve miRNA'lar da bunlardan birtanesidir¹¹⁰. Bu nedenle bu çalışmada, daha önceki

araştırmalarda AMI tanısı almış hastalarda ekspresyon değişimleri açısından ortak fikir oluşturmuş miRNA'lerden hsa-miR-1, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-150, hsa-miR208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR374a-5p, hsa-miR499a-5p ekspresyon düzeylerini ST yükselmesi olan ve olmayan miyokard infarktüslü hasta gruplarında araştırmayı amaçladık.

mikroRNA'lar (miRNA) 19-25 nükleotid uzunluğunda endojen, kodlama yapmayan tek iplikli RNA'lardır. Gen ekspresyonunu düzenlemek için protein kodlayan genlerin hedef m-RNA'larının 3'-translasyona uğramayan bölgeleri (3'UTR) içerisinde bulunan komplementer nükleotid dizilerine bağlanır. miRNA'ların hedef m-RNA'ya bağlanması m-RNA parçalanması veya protein sentezinin inhibisyonuyla hedef genlerin azalmış ekspresyonuna yol açar. Ayrıca miRNA'ların artmış ekspresyonu direkt olarak inhibitör proteinlerin veya transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu azaltarak veya indirekt olarak inhibitör miRNA'ların ekspresyon düzeyini azaltarak önceden susturulmuş hedef genlerin paradoksik upregülasyonuna neden olabilmektedir. miRNA'lar insan genomunda yer alan tüm genlerin > % 2'sinden fazlasını oluşturmakta olup (1000'den fazla mevcuttur), protein kodlayan genlerin ise % 30'undan fazlasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca, miRNA'ların her biri > 1000 hedef gene sahipken; her bir protein kodlayan gen de çok sayıda miRNA tarafından dzenlenmektedir^{70,71}.

miRNA'ların çoğu doku, hücre ve/veya hastalığa spesifik tarzda eksprese olduğundan onların ekspresyon paternleri altta yatan patofizyolojik olayları yansıtmaktadır. miRNA'lar çeşitli vücut sıvılarında ve dokularda saptanabilmektedir. mikroRNA'lar kalpte bulunan miyokard hücrelerinde hasar oluşumu sonrası dolaşıma salınır ve serum veya plazmada stabil formda saptanır. miRNA'ların serum ve plazma düzeyleri koreledir. miRNA'lar plazmada bulunan RNAazlara oldukça dirençli olması, dolaşan miRNA'ların tekrarlayan dondurma ve zdrme olaylarına olan dayanıklılığı ve serum ya da plazmada tekrar tekrar ölçülebilir olması onları hastalıklar için güçlü potansiyel biyomarker adayı yapmaktadır. Ayrıca kaynatma, yüksek veya düşük pH, uzun süreli saklanma gibi olaylara dayanıklı olup formalin ile fikse edilmiş dokularda da stabildir. mikroRNA'ların akut miyokard infarktüsü, kalp yetersizliği, koroner arter hastalığı, diabetes mellitus, inme, esansiyel hipertansiyon ve akut pulmoner emboliyi içeren kardiyovasküler hastalıklar için ideal biyomarker olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda gsterilmiřtir¹⁰⁰.

Kalbin miyokard hasarı sırasında dolaşımdaki miRNA'ların kaynağı olduğunu gösteren ilk klinik çalışma De Rosa ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada koroner arter hastalığı olmayan, stabil koroner arter hastalığı ve troponin pozitif akut koroner sendromlarda aorta ve koroner venöz sinüsten alınan plazma örneklerinde iskelet kası (miR-133a, miR-499 ve miR-155), vasküler (miR-126, miR-92a), lökosit (miR-155) ve trombosit (miR-223) kökenli miRNA'lar izole edilmiş olup troponin pozitif akut koroner sendromlarda stabil koroner arter hastalığına oranla hastaların aortasından alınan örneklerde miR-133a, miR-499 ve miR208a düzeyleri daha yüksek saptanmıştır¹¹⁶.

Zhao ve ark. yaptıkları çalışmada ise miR-1 ve miR-133'ün embriyonik dönemde kardiyak gelişiminde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada miR-1'in aşırı yapımı kardiyomiyosit yapımını baskılayarak ölüme neden olduğu gösterilmiştir. Yine aynı araştırmacı tarafından yapılan çalışmada miR-1 eksikliğinde ventriküler septal defekt saptanmıştır¹⁰⁶.

Yang ve ark. yaptığı çalışmada ise miR-1'in fazla yapımı kardiyak iyon kanallarını etkileyerek aritmiye neden olduğu gösterilmiştir (özellikle kısa PR ve uzun QRS kompleksine bağlı ölüm)¹⁰⁷. Liu ve ark. yaptığı başka bir çalışmada miR-133'ten yoksun farelerde aşırı kardiyak miyosit çoğalması ve apoptozisi, sarkomerlerde düzensizlik ve kardiyak fibrozis görüldüğü rapor edilmiştir¹⁰⁸.

Fichtlscherer ve ark. tarafından yapılan çalışmada, endotel hücrelerinden zengin miRNA'lar (miR-126, miR-17, and miR- 92a), inflamasyonla ilişkili miR-155 ve düz kas ilişkili miR-145'in ekspresyon düzeyleri sağlıklı gönüllülerle karşılaştırılmış ve KAH'da önemli derecede plazma seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar KAH'ı saptamada miRNA'ların potansiyel biyomarker olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, bu çalışmada KAH olan hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinde bakılan miRNA'lardan miR-135a'nın plazma konsantrasyonunun 5 kat arttığı; miR-147 konsantrasyonunun ise 4 kat azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlarla miR-135a/miR-147 oranının KAH için potansiyel biyomarker olabileceğini öngörmektedir¹¹⁰. Aynı çalışmada miR-133a ve miR-208b ekspresyon düzeyleri yüksek bulunurken miR-126, miR-17, miR-92a ve miR-155 ekspresyon düzeyleri düşük bulunmuştur. Diğer bir önemli çalışmada ise unstabil angina pektorisli hastalar yüksek plazma miR-134, miR-198 ve miR-370 düzeyleri ile stabil angina pektorisli hastalardan ayırt edilebilmiş ve bu sonuçlar, miRNA'ların akut koroner sendrom riski taşıyan yüksek riskli hastaları önceden belirlemede yardımcı olabileceğini

düşündürmektedir¹¹¹. Bizim yaptığımız çalışmada ise NSTEMI hasta grubu ve kontrol grubundaki hsa-miR-92a-3p fold change hesabı 0,44, STEMI hasta grubu ve kontrol grubunda 1,34, NSTEMI ve STEMI hasta grubunda 1,31 olarak hesaplanmıştır, fakat NSTEMI hastaları ve kontrol grubu, STEMI hastaları ve kontrol grubu, NSTEMI ve STEMI hastalarındaki hsa-miR-34a-5p miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Akut miyokard infarktüsü (AMI) ile miRNA ilişkisini inceleyen bir çalışmada iskelet ve kalp kasına özgül miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-208a'yı içeren birçok miRNA düzeyinin AMI'li sıçanlarda arttığı gösterilmiştir. Bunlardan miR-1, miR-133a, miR-133b'nin bu konuda yapılmış diğer çalışmalarda iskelet kası hasarında da yüksek saptanması onların kardiyospesifik özelliğini azaltmıştır. miR-208a'nın ise kardiyak doku özgüllüğü yüksek olup semptomların başlangıcından ilk 4 saat içerisinde hastaların %90-%100'ünde kolayca saptanabilmiştir. Aynı çalışmada miR-208a'nın AMI tanısında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu ve yeni bir biyomarker olabileceği vurgulanmıştır. Bu nedenle miR-208 kardiyomiR olarak isimlendirilmektedir. Hatta cTnl AMI sonrası 3. Saatte yükselip 24-48 saatte pik yaparken miR-208 0.saatten sonra yükselip 24 saat kadar yüksek kaldığı rapor edilmiştir¹¹². Bizim yaptığımız çalışmada NSTEMI hastaları ve kontrol grubundaki hsa-miR-1, hsa-miR-133a-3p ve hsa-miR208a-3p fold change hesabı sırasıyla 0, 0,08 ve 1, STEMI hastaları ve kontrol grubu fold change hesabı sırasıyla 0, 0,19 ve 1, NSTEMI ve STEMI hastalarındaki fold change hesabı sırasıyla 0,62, 2,49 ve 1 olarak hesaplanmıştır, fakat miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Bu konuda yapılan diğer iki çalışmada ise ST elevasyonlu miyokard infarktüsünde miR-208a'nın düşük seviyede ve serumda saptanamaz düzeyde olduğu gösterilmiş olup bunun hem miR-208a'nın yarılanma ömrünün kısa olması hem de insan ve sıçanlarda bu miRNA'nın farklı türlere sahip olmasının (insanlarda beta-MHC, sıçanlarda alfa-MHC) bu olaya neden olabileceği düşünülmüştür. Bu uyumsuz çalışma sonuçları AMI hastalarında miR-208a'nın ideal bir biyomarker olmadığını göstermektedir^{113,114}. Ayrıca bu çalışmalarda iskelet kasına özgül miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-499, ve miR-208b'lerin akut ST elevasyonlu AMI'nin ilk 12 saati içerisinde sırasıyla 300 kat, 70 kat, 250 kat ve 3000 kat arttığı gösterilmiş ve ideal bir biyomarker olabileceği iddia edilmişken; Wang ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499'un iskelet kası hasarında da arttığı

saptanmış olup bunların ideal biyomarker olamayacağı düşünülmüştür¹¹³. Bizim yaptığımız çalışmada, kontrol ve hasta grupları arasında miRNA düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Corsten ve ark.'nın kardiyak özgül miRNA (miR-1, miR-133a, miR-208b, ve miR-499), fibrozisle ilişkili miRNA (miR-21 ve miR-29b), ve lökositlerle ilişkili miRNA (miR-146, miR-155, ve miR-223)'ların AMI'deki seviyelerini inceleyen çalışmasında miR-208b, ve miR-499'un sırasıyla 1600 ve 100 kat plazma seviyesinin yükseldiği, plazma seviyelerinin Troponin T ile korele olduğu ve ROC analizleri sonucunda her ikisinin de ideal biyomarker olabileceği düşünülmüştür¹¹⁵. Bizim yaptığımız çalışmada NSTEMI hastaları ve kontrol grubundaki hsa-miR208a-3p ve hsa-miR499a-5p fold change hesabı sırasıyla 1, 0, STEMI hastaları ve kontrol grubu fold change hesabı sırasıyla 1, 0, NSTEMI ve STEMI hastalarındaki fold change hesabı sırasıyla 1, 41 olarak hesaplanmıştır, fakat miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,05$).

Ward ve arkadaşlarının STEMI ve NSTEMI tanısı almış hastalarda yaptığı çalışmada, plazma miR 25-3p ve 374b-5p, platelet miR 25-3p ve 221-3p ve periferik kan mononükleer hücre miR 25-3p, 221-3p ekspresyon düzeyleri STEMI tanısı almış hastalarda NSTEMI tanısı almış hastalara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Yine aynı çalışmada plazma miR 30d-5p ekspresyon düzeyleri STEMI tanılı hastalarda NSTEMI tanılı hastalara göre düşük, plazma miR 483-5p ekspresyon düzeyleri ise yüksek bulunmuştur ve bu miRNA'ların ideal biyomarker olabileceği düşünülmüştür¹¹⁷. Bizim yaptığımız çalışmada NSTEMI hastaları ve kontrol grubundaki hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-221-3p ve miR-374a-5p fold change hesabı sırasıyla 0,57, 1,84, 1,48 ve 0, STEMI hastaları ve kontrol grubu fold change hesabı sırasıyla 1,21, 1,18, 1,68 ve 0, NSTEMI ve STEMI hastalarındaki fold change hesabı sırasıyla 1,10, 1,71, 1,50 ve 1,08 olarak hesaplanmıştır, fakat miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,05$).

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miR-150 özellikle NSTEMI tanılı hastalar olmak üzere AMI'ünde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada ise NSTEMI hasta grubu ve kontrol grubundaki hsa-miR-150 fold change hesabı 0,09, STEMI hasta grubu ve kontrol grubunda 0,62, NSTEMI ve STEMI hasta grubunda 1,38 olarak hesaplanmıştır, fakat NSTEMI hastaları ve kontrol grubu,

STEMI hastaları ve kontrol grubu, NSTEMI ve STEMI hastalarındaki hsa-miR-150 miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Boon ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada miR-34a'nın kalp hücrelerinde yaşlanmaya yol açtığı, bu miRNA'yı hedef alacak terapinin de AMI sonrası miyositlerde iyileşmeyi hızlandırdığı ve fibrozisi önlediği gösterilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise NSTEMI hasta grubu ve kontrol grubundaki hsa-miR-34a-5p fold change hesabı 0,85, STEMI hasta grubu ve kontrol grubunda 0,52, NSTEMI ve STEMI hasta grubunda 2,22 olarak hesaplanmıştır, fakat NSTEMI hastaları ve kontrol grubu, STEMI hastaları ve kontrol grubu, NSTEMI ve STEMI hastalarındaki hsa-miR-34a-5p miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Sonuç olarak bizim yaptığımız çalışmada, daha önceki çalışmalarda AMI ile ilişkili olabileceği düşünülmüş miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

NSTEMI hasta grubu ve kontrol grubundaki hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-30d-5p miRNA'ların fold change hesabı 1'in üzerindeydi, fakat kontrol grubu ile NSTEMI hastalarının miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

STEMI hastaları ve kontrol grubundaki hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-92a-3p miRNA'ların fold change hesabı 1'in üzerindeydi, fakat kontrol grubu ile STEMI hastalarının miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

NSTEMI ve STEMI hasta gruplarında hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-150, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-374a-5p miRNA'ların fold change hesabı 1'in üzerindeydi, fakat iki hasta grubunun miRNA ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Sonuç olarak hasta grubu ile kontrol grubunun karşılaştırıldığında hsa-miR-1, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-150, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR374a-5p, hsa-miR499a-5p ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

mikroRNA'larla yapılan profil tarama çalışmaları ile bu alanda yeni potansiyel biyomarkerler bulunmuş olup; klinik ve laboratuvar parametreleriyle korelasyonlarının da gösterilmesiyle miRNA'ların tanısal ve prognostik gücü daha iyi anlaşılacaktır. Bu yeni gelişmeler sayesinde gelecek yüzyılda akut koroner sendrom başta olmak üzere kardiyovasküler hastalıkların tanı ve tedavisinde miRNA'lar kullanılacaktır, fakat bu miRNA'ların akut koroner sendrom tanısı için bir erken biyobelirteç olduğunu söyleyebilmek için daha ileri ve geniş popülasyonlu çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Onat A. Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı, yeni koroner olaylar ve kalpten olum sıklığı. Onat A, TEKHARF 2009, Figur Grafik ve Matbaacılık, İstanbul, TR, 2009; 20-26
2. The global burden of disease: 2004 update , World Health Organization 2008. <http://www.who.int>
3. Roe MT, Ohman EM, Pollack CV, Peterson ED, Brindis RG, Harrington RA, et al. Changing the model of care for patients with acute coronary syndromes. Am Heart J 2003; 146: 605-612.
4. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined- a consensus document of the Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee for the redefiniton of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2000;36:959-969
5. Meder B, Keller A, Vogel B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, et al. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. Basic Res Cardiol. 2011; 106:13–23.
6. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 391:73–77.
7. Eriksson S, Wittfooth S, Pettersson K. Present and future biochemical markers for detection of acute coronary syndrome. Crit Rev Clin Lab Sci 2006; 43: 427-495.
8. Camm AJ, Lüscher TF, Serruys PW editors. Acute coronary syndromes: Pathophysiology, diagnosis and risk stratification and management of acute coronary syndromes. The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine. Oxford: Blackwell publishing Ltd, 2006: 333-391.
9. Korkmaz M.E. İskemik Kalp Hastalıkları, Kadayıfçı A., Karaslan Y. ed. İç Hastalıkları El Kitabı Hekimler Yayın Birliği Matbaası, Ankara, 1998:51-68
10. Armstrong A, Duncan B, Oliver MF. Natural history of acute coronary heart attacks. A community study. Br Heart J 1972;34: 67-80.
11. Tunstall-Pedeo H, Kuulasmaa K, Mahonen. Contribution of trends of survival and coronary event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-

- year results from WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet* 1999;353: 1547-1557.
12. Van de Werf F, Ardissino D, Betriu A, Cokkinos DV, Faik E, Fox KAA et.al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the management of Acute Myocardial Infarction of The European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2003 ;24: 28-66.
 13. Hasdai D, Begar S, Wallentin. A prospective survey of the characteristics, treatments and outcomes of patients with acute coronary syndrome in Europe and the Mediterranean basin. The Euro Heart Survey of Acute Coronary Syndromes (Euro Heart Survey ACS). *Eur Heart J* 2002;15: 1190-1201.
 14. Biasucci LM. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: clinical use of inflammatory markers in patients with cardiovascular diseases: a background paper. *Circulation*. 2004;110: 560-567.
 15. Schindler TH, Nitzsche EU, Olschewski M, Magosaki N, Mix M, Prior JO et.al. Chronic inflammation and impaired coronary vasoreactivity in patients with coronary risk factors. *Circulation*. 2004;110: 1069-1075
 16. Tomai F, Crea F, Gasparone A, Versaci F, Ghini AS, Chiariello L. et.al. Unstable angina and elevated C-reactive protein levels predict enhanced vasoreactivity of the culprit lesion. *Circulation*. 2001;104: 1471-1476.
 17. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
 18. Spagnoli LG, Bonanno E, Sangiorgi G, Mauriello A. Role of inflammation in atherosclerosis. *J Nucl Med*. 2007;48: 1800-1815.
 19. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes, *Heart*. 2000;83: 361-366.
 20. Schaar JA, Muller JE, Falk E, Virmani R, Fuster V, Serruys PW, et.al. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque. *Eur Heart J*. 2004;25: 1077-1082.
 21. Falk E, Shah PK, Fuster V. Atherothrombosis and Thrombosis-Prone Plaques. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA. et al. eds. *Hurst's the Heart* 2004:1123-1139.
 22. Libby P. Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2001;104:365-372.

23. Falk E, Thuesen L. Pathology of Coronary Microembolisation and No Reflow. *Heart* 2003;89:983-985.
24. Bogaty P, Hackett D, Davies G, Maseri A. Vasoreactivity of the Culprit Lesion in Unstable Angina. *Circulation* 2000;101:841-843.
25. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al: Elevated Levels of Shed Membrane Microparticles with Procoagulant Potential in the Peripheral Circulating Blood of Patients with Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2000;101:841-843.
26. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic Impact of Coronary Vasodilator Dysfunction on Adverse Long-Term Outcome or Coronary Heart Disease. *Circulation* 2000;101:1899-1906.
27. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread Coronary Inflammation in Unstable Angina. *N Eng J Med* 2002;347:5-12.
28. Reimer KA, Jennings RB. The 'Wavefront Phenomenon' of Myocardial Ischemic Cell Death. II. Transmural Progression of Necrosis within the Framework of Ischemic Bed Size (myocardium at risk) and Collateral Flow. *Lab Invest* 1979;40:633-644.
29. Stary H.C. et al. *Circulation* 1995;92:1355-1374.
30. Monaco C, Mathur A, Martin JF. What causes acute coronary syndromes? Applying Koch's postulates. *Atherosclerosis* 2005; 179: 1-15.
31. Schoene NW. Design Criteria: tests used to assess platelet function. *Am J Clin Nutr.*1997; 65(Sup):1665-1685
32. Nilsson, Peter M. Smoking as an independent risk factor for myocardial infarction or stroke in type 2 diabetes: a report from the Swedish National Diabetes Register *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*: August 2009 - Volume 16 - Issue 4 - pp 506-512
33. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2004. Available at:http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/global_health_risks/en/index.html. Accessed December 23, 2009.
34. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the

- Management of Patients With Unstable Angina). J Am Coll Cardiol. 2000;36:970- 1006.
35. Müderrisoğlu H, Yıldırım A: Akut koroner sendromlar ve sınıflaması. Türk Kardiyoloji Dergisi, Akut koroner sendromlar ek sayı 2001; 4: 12-15.
 36. Brooks N, Hackett D, Dargie H et al. Guideline for the management of with acute coronary syndromes without persistent ECG ST segment elevation. Heart 2001; 85: 133-42.
 37. James SK, Armstrong P, Barnathan E, et al. Troponin and C-reactive protein have different relations to subsequent mortality and myocardial infarction after acute coronary syndrome. A GUSTO-IV substudy. J Am Coll Cardiol. 2003; 41: 916- 924.
 38. Yusuf S, Flather M, Pogue J, et al. Organisation to Assess Strategies for Ischaemic Syndromes(OASIS) Registry investigators. Variations between 49 countries in invasive cardiac procedures and outcomes in patients with suspected (unstable angina or myocardial infarction without initial ST elevation. Lancet 1998; 352: 507- 14
 39. TIMI IIIB Investigators. Effects of tissue plasminogen activator and a Comparison of early invasive and conservative strategies in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. Results of the TIMI IIIB trial thrombolysis in myocardial ischemia. Circulation 1994; 89: 1545-1556.
 40. Braunwald E, Jones RH, Mark DB, Brown J, Brown L, Cheitlin MD, Concannon CA, Cowan M, Edwards C, Fuster V. Diagnosing and managing unstable angina. Agency for Health Care Policy and Research. Circulation 90: 613-22, 1994.
 41. Tunstall Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. Circulation 90: 583-612, 1994
 42. Tokem Y. B. (1999) AMI Geçiren Hastalara Uygulanan Eğitim Programının Bakım Sonuçlarına Etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, İzmir.
 43. Özdemir M. (1987) AMI Geçiren Alkol Alışkanlığı Olan ve Olmayan Vakaların Akut Dönemdeki Komplikasyonlarının Karşılaştırılması, *Uzmanlık Tezi*, İstanbul.
 44. Çalangu S., Güler C. (1995) Acil Dahiliye, İstanbul Güzel Sanatlar Matbaası.

45. Delibay N. (1998) Toplumun AMI ile İlgili Bilgi Düzeylerinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İzmir.
46. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease: report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization Task Force on Standardization of Clinical Nomenclature. *Circulation* 1979;59: 607-608.
47. Gregoratos G. Clinical Manifestations of Acute Myocardial Infarction in Older Patients. *Am J Geriatr Cardiol.* 2001 10:345-347.
48. Lee TH, Cook EF, Weisberg M, Sargent RK, Wilson C, Goldman L. Acute Chest Pain in the Emergency Room. Identification and Examination of Low Risk Patients. *Arch Intern Med* 1985;145:65-69.
49. Gök H. Klinik Kardiyoloji, Ankara, Nobel Kitabevi. (1996)
50. Pekus M. The Merck Manuel Teşhis ve Tedavi El Kitabı 1, 3, İstanbul, Merke Yayınları. (1985)
51. Birol L., Akdemir N., Bedük T. İç Hastalıkları Hemşireliği (4.Baskı) Ankara, Koç Vakfı Yayınları. (1993)
52. Tosun N. AMI Geçiren Hastalarda Alınan Koroner Önlemlerin İyileşme Sürecine Etkisinin Belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara. (1997)
53. Kosuge M, Kimura K, Ishikawa T, et al. ST Segment Elevation Pattern In Predicting Infarct Size And Left Ventricular Function at Discharge In Patients With Reperfused Acute Anterior Myocardial Infarction. *Am Heart J* 1999;137:522-527
54. Christenson RH, Duh SH Evidence based approach to practice guides and decision thresholds for cardiac markers. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1999; 230: 90-102.
55. Gök H, Akut koroner sendromların tanısında yeni biyokimyasal markerler. *Türk Kardiyoloji Seminerleri*, 2001;1;20-32
56. Ammann P, Fehr T, Minder EI, Gunter C, Bertel O. Elevation of troponin I in sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2001; 27: 965-969.
57. Wu AH, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R Jr. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem* 1999;45:1104-1121

58. Lin SL, Miller JD, Ying SY. Intronic MicroRNA (miRNA). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006; 2006: 1–13.
59. Salta E, Strooper BD. Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol*, 2012; 11: 189–200.
60. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* result in suppression of homologous reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* 1990;2:279-89
61. Alexander R, Krol VD, Lenting PE, et al. An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 1988;333. 866-869.
62. Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in *petunia* flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* 1996;32(5): 957-73.
63. Jorgensen RA. Altered Gene Expression in Plants Due to Trans Interactions Between Homologous Genes. *Trends Biotechnology* 1990;8: 340-44
64. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75: 843–54.
65. Hammond SM. MicroRNA therapeutics: a new niche for antisense nucleic acids. *Trends Mol Med*. 2006;12(3):99-01.
66. Ruvkun G. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, 2001; 294: 797–99.
67. Pasquinelli EA, Reinhart JB. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 2000;408:86-9.
68. Ketting RF. Dicer function in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C.elegans*. *Genes Dev*. 2001;15,:2654-59.
69. Reinhart BJ, Slack FJ. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000;403:901–06.
70. Voorhoeve, P. M. & Agami, R. Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly. *Biochim Biophys Acta* 1775, 274-282, doi:S0304-419X(06)00064-3 [pii]10.1016/j.bbcan.2006.11.003.
71. Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19, 92-105, doi:gr.082701.108 [pii]10.1101/gr.082701.108.

72. Ambros V, Bartel B, Burge CB. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003;9:277–79.
73. Jones SG, Grocock RJ, Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: MicroRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucl. Acids. Res.* 2006;34:D140–D44.
74. Jones SG, Saini HK. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 2008; 36: D154–D58.
75. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(9): 2999-04.
76. Shomron N, Levy C. microRNA Biogenesis and Pre-mRNA Splicing Crosstalk. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009; Article ID: 594678, doi10.1155/2009/594678.
77. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14: 1902-10.
78. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, et al. New microRNAs from mouse and human. *RNA* 2003;9: 175-79.
79. Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104: 17719-24.
80. Kwak PB, Iwasaki S. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*, 2010;101:2309-15.
81. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. An excellent review of plant and animal miRNAs that discusses how miRNAs differ from siRNAs. *Cell*, 2004;116:281–97.
82. Cai X, Hagedorn CH. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 2004; 10, 1957–66.
83. Bentwich, I. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature Genet*, 2005; 37:766–770.
84. Lee Y, Ahn C. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003;425:415-19.
85. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006;6:259-69.

86. Denli AM, Tops BB. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 2004;432(7014):231-35.
87. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004; 432(7014):235-40.
88. Joshua E, Blelloch R . Small RNAs – their biogenesis, regulation and function in embryonic stem cells. In: Kit T Rodolfa *StemBook [Internet]*.Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute 2008:1-14.
89. Elsebet L, Stephan G. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*.2004; 303:95-98. 36.
90. Zhang H, Kolb FA. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*.2002; 21:5875-85
91. Bernstein E, Caudy AA. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409:363-66.
92. Kong, YW, Cannell IG. The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene. *PNAS*, 2008;105(26); 8866-71.
93. Pillai RS, Bhattacharyya SN. Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells. *Science*, 2005;309;1573-76.
94. Gregory RI, Chendrimada TP. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 2005;123: 631-40.
95. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Mol Oncol*, 2010;4:23041.
96. Marjorie PP, Provost P. Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front. Biosc*. 2008;13:2537-47.
97. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:369–78.
98. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA. *RNA*, 2005;11:1753–61.
99. A.Turchinovich, T. R. Samatov, A.G. Tonevitsky and B Burwinkel, Circulating miRNAs: cell–cell communication function *Front. Genet.*, 28 June 2013
100. Circulation Research.2012; 110: 496-507
doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247916
101. Pervasive roles *Nature* 469, nature09783 of microRNAs in cardiovascular biology 336–42 doi:10.1038

102. Weiler J, Hunziker J, Hall J (2006) Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther* 13:496–502
103. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438:685–89
104. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA (2007) MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* 4:721–26.
105. Xiao J, Yang B, Lin H, Lu Y, Luo X, Wang Z Novel approaches for genespecific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4. *J Cell Physiol*(2007) 212:285–92
106. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005;436:214–20.
107. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007;13:486–91.
108. Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 2008;22:3242–54.
109. Ning Liu et al. MicroRNA Regulatory Networks in Cardiovascular Development. *Developmental Cell* 2010.
110. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M et al (2010) Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 107:677–84.
111. Hoekstra M, van der Lans CA, Halvorsen B, Gullestad L, Kuiper J, Aukrust P, van Berkel TJ, Biessen EA (2010) The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun* 394:792–97.
112. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q (2010) Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 31:659–66.

113. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M et al (2010) Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 31:2765–73
114. Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, Götberg M, Erlinge D(2011) Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology* 118:217–26.
115. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B (2010) Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 3:499–06.
116. De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM (2011) Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs. *Circulation*. doi:10.1161/CIRCULATION.AHA.111.037572.
117. Ward J, Esa N, Pidikiti R, Freedman J, Keaney J, Tanriverdi K, Vitseva O, Ambros V, Lee R, McManus D Circulating Cell and Plasma microRNA Profiles Differ between Non-ST-Segment and ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction *Fam Med Med Sci Res*. 2013 October 1; 2(2): 108–. doi:10.4172/2327-4972.1000108.
118. Zhang R, Lan C, Pei H, Duan G, Huang L, Li L Expression of circulating miR-486 and miR-150 in patients with acute myocardial infarction *BMC Cardiovascular Disorders* (2015) 15:51 DOI 10.1186/s12872-015-0042-0
119. Boon RA, Lekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, Kaluza D, Tréguer K, Carmona G, Bonauer A, Horrevoets AJ, Didier N, Girmatsion Z, Biliczki P, Ehrlich JR, Katus HA, Müller OJ, Potente M, Zeiher AM, Hermeking H, Dimmeler S. microRNA-34a regulates cardiac ageing and function *Nature* 495, 107–110 doi:10.1038/nature11919

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl: Mikrolitre

3'UTR: 3' ucu yazılıma uğramayan bölge

Ago: Argonaute

AKS: Akut koroner sendrom

AMI: Akut miyokard infarktüsü

AMO: Anti-miR oligonükleotid

ark: arkadaşları

CK: Kreatin kinaz

cDNA: komplementer DNA

DNA: Deoksiribonükleik asit

DGCR8: Di George syndome critical region gene 8

DNAaz: Deoksiribonükleaz

EKG: Elektrokardiyografi

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

hsa: homo sapiens

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

KAH: Koroner arter hastalığı

LDH: Laktat dehidrogenaz

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

miRNA, miR: mikroRNA

mL: mililitre

mRNA: mesajcı ribonükleik asit

ncRNA: protein kodlamayan RNA

RNAaz: Ribonükleazsız

ORF: Açık okuma çerçevesi

PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1

pre-miRNA: prekürsör miRNA

pri-miRNA: primer miRNA

rpm: dakikadaki devir sayısı

NSTEMI: ST yükselmesiz miyokard infarktüsü

siRNA: küçük interfere edici RNA

STEMI: ST yükselmeli miyokard infarktüsü

TRBP: TAR-RNA bağlayıcı protein

USAP: stabil olmayan anjina pectoris

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

vwf: von willebrand faktörü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1: Ateroskleroz oluşum süreci	12
Şekil 2: ST Yükselmeli ve ST Yükselmez Akut Miyokard İnfarktüsü Tipleri	14
Şekil 3: ST Segment Yükseklik Şekillerinin Şematik Görünümü	20
Şekil 4: miRNA'ların Biyogenezi	26
Şekil 5: miRNA'ların Mirton lokuslarından biyogenezi	27
Şekil 6: miRNA Fonksiyonları	29
Şekil 7: miRNA'ların Hücre Dışına Salınımları	30
Şekil 8: miRNA Temelli Tedavi Seçenekleri	31
Şekil 9: NSTEMI ve kontrol gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri	46
Şekil 10: NSTEMI ve kontrol gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri	47
Şekil 11: NSTEMI ve STEMI hasta gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri	48

TABLolar DİZİNİ

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1: Aterosklerotik Kalp Hastalığı İçin Risk Faktörleri	13
Tablo 2: Akut Koroner Sendrom Tipleri	14
Tablo 3: AMI Tanısında Biyokimyasal Belirteçler	22
Tablo 4: Çalışmaya dahil edilen tüm gruplara ait demografik özellikler	42
Tablo 5: STEMI, NSTEMI ve kontrol gruplarına ait demografik özellikler	43
Tablo 6: STEMI ve NSTEMI hasta gruplarına ait demografik özellikler	44
Tablo 7: NSTEMI ve kontrol gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri	45
Tablo 8: STEMI ve kontrol gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri	46
Tablo 9: NSTEMI ve STEMI hasta gruplarına ait miRNA ekspresyon düzeyleri	48