

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**AŞIRI AKTİF MESANELİ HASTALARDA ADRB3, ARHGEF10, ROCK2 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN VE BU GENLERLE İLGİLİ MİKRORNA'LARIN
KLİNİK BULGULAR İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ELİF FIRAT

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. HÜLYA AYBEK

DENİZLİ-2018

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**AŞIRI AKTİF MESANELİ HASTALARDA ADRB3, ARHGEF10, ROCK2 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN VE BU GENLERLE İLGİLİ MİKRORNA'LARIN
KLİNİK BULGULAR İLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ELİF FIRAT

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. HÜLYA AYBEK

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin
18.07.2017 tarih ve 2017TIPF008 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2018

Prof. Dr. Hülya Aybek danışmanlığında Dr. Elif Fırat tarafından yapılan “Aşırı aktif mesaneli hastalarda ADRB3, ARHGGEF.0, ROCK2 gen polimorfizmlerinin ve bu genlerle ilgili mikroRNA’ların klinik bulgular ile ilişkisi” başlıklı tez çalışması 06/11/2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Prof. Dr. Süleyman DEMİR



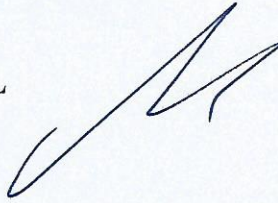
ÜYE

Prof. Dr. Hülya AYBEK



ÜYE

Prof. Dr. Aslıhan KARUL



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Osman Çiftçi
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim boyunca beni destekleyen, bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Hülya Aybek'e, tıpta uzmanlık eğitimimin ilk gününden itibaren bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım Prof. Dr. Süleyman Demir, Prof. Dr. Diler Aslan, Prof. Dr. Yaşar Enli, Dr. Öğr. Üyesi Esin Avcı ve Dr. Öğr. Üyesi Rukiye Nar'a eğitimime yaptıkları katkılar için teşekkür ederim. Tez konumun belirlenmesinde ve örneklerin toplanmasındaki emekleri için Prof. Dr. Zafer Aybek'e, eğitimim süresince birlikte görev yaptığım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Nergiz Zorbozan, Uzm. Dr. Fahrigür Dede ve Dr. Kadriye Akpınar'a, örneklerin toplanması sırasında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Oğuz Peker, Uzm. Dr. Turab Ulaşoğlu, Uzm. Dr. Mustafa Çetinkaya, Uzm. Dr. Adem Yaşar, Dr. Kürşat Küçük ve Biyolog Birsen Teke ile tüm laboratuvar çalışanı arkadaşlarıma, tez çalışmamın istatistik çalışmaları konusunda yardımcı olan Hande Şenol'a, laboratuvar analiz çalışmaları sırasındaki destekleri için Prof. Dr. Hakan Akça, Şakir Akgün, Özge Can ve Hakan Küçükseyan'a teşekkür ederim.

Her konuda hep yanımda olan en değerli varlığım eşim Erhan Fırat ile hayatımın her anında varlıklarıyla bana güç veren en büyük desteğim babam Ümmet Başak, annem Güngör Başak ve kardeşim Mehmet Ertan Başak'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ	vii
TABLOLAR ÇİZELGESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xv
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
MESANE ANATOMİSİ	4
MESANE İNNERVASYONU	4
MİKSİYON FİZYOLOJİSİ.....	5
AŞIRI AKTİF MESANE VE TANISI	6
AŞIRI AKTİF MESANE PATOFİZYOLOJİSİ.....	6
DETRÜSÖRDE KOLİNERJİK VE ADRENERJİK YOLAKLAR.....	8
Kolinerjik Yolaklar	10
Adrenerjik Yolaklar	14
AŞIRI AKTİF MESANE TEDAVİSİ	15
MİKRORNA	16
Genomda miRNA Geni	17
MiRNA Biyogenezi	17
MiRNA Fonksiyonları	18
MiRNA Gen Düzenlenmesi.....	19
GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
ÇALIŞMA GRUBU	21
Hasta Grubu	21
Kontrol Grubu.....	21
Etik kurul onayı	21
KULLANILAN MALZEMELER VE CİHAZLAR	22
Kullanılan Cihazlar	22
Kullanılan Sarf Malzemeleri.....	22

Kullanılan Kitler	22
ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE ANALİZE HAZIRLANMASI.....	23
PERİFERİK KANDAN DNA VE RNA ELDE EDİLMESİ	23
DNA İzolasyonu Protokolü	23
RNA İzolasyonu Protokolü	24
CDNA ELDESİ	25
REAL TIME-PCR METODU	26
GENOTİPLEMESİ YAPILACAK SNP SEÇİMİ.....	28
EKSPRESYON ANALİZİ YAPILACAK MİRNA SEÇİMİ	28
GENOTİP ANALİZİ.....	29
GENOTİPİK DEĞERLENDİRME	30
MİRNA EKSPRESYON ANALİZİ.....	33
İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	35
BULGULAR.....	36
HASTA VE KONTROL GRUPLARINA AİT KİŞİSEL VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	36
GRUPLARIN POLİMORFİZMLERE AİT GENOTİP VE ALLEL DAĞILIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	37
1. ADRB3-rs4994 Polimorfizmine Ait Genotip ve Allel Dağılımının Değerlendirilmesi.....	37
2. ARHGEF10-rs4376531 Polimorfizmine Ait Genotip ve Allel Dağılımının Değerlendirilmesi	38
3. ROCK2-rs2230774 Polimorfizmine Ait Genotip ve Allel Dağılımının Değerlendirilmesi.....	38
HASTALARDA GENOTİPİK DAĞILIMA GÖRE AAM SEMPTOM SKORU DEĞERLENDİRİLMESİ.....	40
MİRNA'LARIN EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	41
1. Hsa-let-7b-5p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	43
2. Hsa-miR-92a-3p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	44
3. Hsa-miR-98-5p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	45
4. Hsa-miR-139-5p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	46
5. Hsa-miR-142-3p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	47

6. Hsa-miR-200c-3p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	48
MİRNA'LARIN ROC DEĞERLENDİRİLMESİ.....	48
TARTIŞMA.....	54
SONUÇLAR.....	64
KAYNAKLAR.....	65
EKLER	76
Ek-1.....	76



ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil 1. Mesanenin innervasyonu	5
Şekil 2. Mesanenin innervasyonu 2	9
Şekil 3. Kolinerjik ve adrenerjik yolakta ikinci mesajcı sistem	9
Şekil 4. M3 reseptörü üzerinden detrüsör kası kasılmasında görev alan sinyal yolları.....	12
Şekil 5. Rho-GEF etkileşimi.....	13
Şekil 6. Detrüörde $\beta 3$ reseptör aracılı gevşeme mekanizması	15
Şekil 7. Tipik miRNA sentez yolağı.....	18
Şekil 8. MiRNA ve hedef mRNA eşleşmesi	19
Şekil 9. TaqMan ve SYBR Green RT-PCR basamakları	27
Şekil 10. Homozigot Atasal Genotip	31
Şekil 11. Heterozigot Polimorfik Genotip	32
Şekil 12. Homozigot Polimorfik Genotip.....	32
Şekil 13. Allelik Diskriminasyon Grafiğı	33
Şekil 14. Logaritmik RT-PCR ekspresyon eğrileri	34
Şekil 15. Genotip dağılımı yüzde verileri grafiğı	37
Şekil 16. Allel dağılımı yüzde verileri grafiğı	37
Şekil 17. AAM hastalarında plazmada tespit edilemeyen miRNA'lar için örnek PCR plate görüntüsü	41
Şekil 18. AAM'li hastalarda ve kontrol grubunda hsa-let-7b'ye ait göreceli ekspresyon değerleri A) Ortanca Değerleri B) Ekspresyon dağılımları	43
Şekil 19. AAM'li hastalarda ve kontrol grubunda hsa-miR-92a-3p'ye ait göreceli ekspresyon değerleri A) Ortanca Değerleri B) Ekspresyon dağılımları	44
Şekil 20. AAM'li hastalarda ve kontrol grubunda hsa-miR-98-5p'ye ait göreceli ekspresyon değerleri A) Ortanca Değerleri B) Ekspresyon dağılımları	45
Şekil 21. AAM'li hastalarda ve kontrol grubunda hsa-miR-139-5p'ye ait göreceli ekspresyon değerleri A) Ortanca Değerleri B) Ekspresyon dağılımları	46
Şekil 22. AAM'li hastalarda ve kontrol grubunda hsa-miR-142-3p'ye ait göreceli ekspresyon değerleri A) Ortanca Değerleri B) Ekspresyon dağılımları	47
Şekil 23. AAM'li hastalarda ve kontrol grubunda hsa-miR-200c-3p'ye ait göreceli ekspresyon değerleri A) Ortanca Değerleri B) Ekspresyon dağılımları	48

Şekil 24. MiRNA'ların ROC Eğrileri ve İşaretlenmiş Kestirim Değerleri	50
Şekil 25. MiR98, miR200c, miR92a, miR142, miR7b, miR139 için ROC Eğrileri	51
Şekil 26. MiRNA kombinasyonlarının ROC Eğrileri.....	53



TABLolar ÇİZELGESİ

Tablo 1. RT için reaksiyon içeriği	25
Tablo 2. RT sıcaklık protokolü	25
Tablo 3. Genotipleme için PCR içeriği.....	30
Tablo 4. Genotipleme için PCR reaksiyon koşulları	30
Tablo 5. MiRNA ekspresyon analizi için PCR içeriği	34
Tablo 6. MiRNA ekspresyon analizi için reaksiyon şartları.....	34
Tablo 7. Hasta ve kontrol gruplarında yaş, boy, kilo, bel çevresi ve BMI değerleri	36
Tablo 8. ADRB3, ARHGEF10, ROCK2 genleri için genotip dağılımları	39
Tablo 9. ADRB3, ARHGEF10, ROCK2 genleri için allel dağılımları	39
Tablo 10. Hastaların genotiplerine göre AAM semptom skorları	41
Tablo 11. AAM'li hastalar ve kontrol grubunda miRNA ekspresyon düzeyleri ($2^{-\Delta Ct}$)	42
Tablo 12. MiRNA'ların ROC eğrilerine göre AUC ve p değerleri.....	49
Tablo 13. MiRNA'ların ROC eğrilerine göre duyarlılık (%), özgülük (%) ve kestirim değerleri	51
Tablo 14. MiRNA kombinasyonlarının ROC eğrilerine göre AUC, p, duyarlılık (%) ve özgülük (%) değerleri.....	52

KISALTMALAR

AAM	: Aşırı aktif mesane
GERF	: Guanin nükleotid değiştirici faktör
ROK/ROCK/RhoKinaz	: Rho ilişkili kinaz
miRNA	: mikroRNA
PVR	: Post Voiding Residü
NO	: Nitrik oksit
ACH	: Asetilkolin
ATP	: Adenozin trifosfat
GTP	: Guanozin trifosfat
GDP	: Guanozin difosfat
Ca	: Kalsiyum
MLCK	: Miyozin hafif zincir kinaz
MLC	: Miyozin hafif zinciri
MBS	: Miyozin bağlayıcı alt ünite
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
G	: Guanin
T	: Timin
C	: Sitozin
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
ADRB3	: Adrenerjik reseptör β 3
ncRNA	: Kodlanmayan RNA
mRNA	: Mesajcı RNA
UTR	: Untranslated region/translasyona uğramayan bölge
ORF	: Opening reading frame/proteine kodlanan diziler
nt	: Nükleotid

RISC	: RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi
FXR 1	: Fragile X mental retardation protein 1
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT	: Revers (ters) transkripsiyon
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
cDNA	: Komplementer DNA
LNA	: Locked nükleik asit
ROC	: Receiver Operating Characteristic
AUC	: Area Under Curve/ Eğri altında kalan alan
NGF	: Nerve Growth Factor
BDNF	: Brain Derived Neurotrophic Factor
Ct	: Cycle threshold/Eşik siklus

ÖZET

Aşırı aktif mesaneli hastalarda ADRB3, ARHGEF10, ROCK2 gen polimorfizmlerinin ve bu genlerle ilgili mikroRNA'ların klinik bulgular ile ilişkisi

Dr. Elif FIRAT

Mesanedeki adrenerjik ve muskarinik reseptörler işeme fizyolojisinde önemli rol oynar. Adrenerjik beta 3 ve muskarinik 3 reseptörlerin işlevi aşırı aktif mesane (AAM) sendromunun patogeneğinde önemlidir. Tek nükleotid polimorfizmlerinin, çeşitli hastalıklara yol açmasının yanı sıra AAM patofizyolojisinde de rol aldığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Plazmada, tespit edilebilen ve potansiyel olarak bir hastalığa özgü olan, birçok kararlı mikroRNA (miRNA) varlığı gösterilmiştir. Bazı miRNA'ların plazma düzeylerindeki değişikliklerin, adrenerjik ve muskarinik reseptörlerin işlevinin düzenlenmesini moleküler düzeyde etkilediği ve klinik bulguların değerlendirilmesinde yararlı olabileceği ileri sürülmektedir. AAM hastalığı ile ilişkili olabilecek miRNA çalışması çok azdır. Bu çalışmanın amacı, AAM sendromlu kadınlarda ADRB3, ARHGEF10 ve ROCK2 gen polimorfizmlerinin detrusör kasılma ve gevşemesi üzerindeki etkisi olup olmadığını ve bu genleri hedef olarak AAM patogeneğinde rol alabileceği öngörülen let-7b-5p, miR-92a-3p, miR-98-5p, miR-139-5p, miR-142-3p ve miR-200c-3p miRNA'larının plazma düzeylerinin AAM tanısı için yardımcı parametreler olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmaktır.

Çalışmamızda idiyopatik AAM tanısı alan 60 hasta ve 60 kontrol bireyinin tam kan örneğinden DNA izolasyonu sonrası ADRB3 genindeki rs4994 polimorfizmi, ARGHEF10 genindeki rs4376531 polimorfizmi ve ROCK2 genindeki rs2230774 polimorfizmi kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile tespit edildi. Aynı hasta ve kontrol grubunda plazmadan qRT-PCR yöntemi ile ADRB3 gen bölgesini hedef alan hsa-let-7b-5p, hsa-miR-98-5p; ARHGEF10 gen bölgesini hedef alan hsa-miR-92a-3p; ROCK2 gen bölgesini hedef alan hsa-miR-139-5p, hsa-miR-142-3p ve hsa-miR-200c-3p miRNA'larının plazma ekspresyon

düzelelerine bakıldı. Plazma miRNA'larının tanısal yeterliliğini değerlendirmek üzere alıcı işletim karakteristikleri eğrileri (ROC) oluşturuldu.

Hasta ve kontrol grubunda ortalama ağırlık, boy ve vücut kütle indeksi benzerdi. Her üç SNP için hastalar ve kontroller arasındaki allel frekanslarındaki dağılım istatistiksel olarak farklı değildi. AAM hastalarında ADRB3, ARHGEF10 ve ROCK2 genlerinin genotipik dağılımı da kontrol grubundan farklı değildi. AAM hastalarında ADRB3 ve ARHGEF10 gen polimorfizmleri ile AAM semptom skoru arasında ilişki bulunmazken, ROCK2 geninde heterozigot polimorfik bireylerde AAM semptom skoru, homozigot polimorfik bireylerden anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$). AAM semptom skoru ile miRNA ekspresyon düzeyleri arasında bir korelasyon olmasa da; let-7b-5p, miR-92a-3p, miR-98-5p, miR-142-3p ve miR-200c-3p ifadeleri AAM hastalarında kontrollere göre anlamlı olarak yüksekti. Plazma miR-139-5p düzeyi ise AAM hastalarında kontrollere göre anlamlı olarak azalmıştı. Yapılan ROC eğrisi analizleri tüm miRNA'lar için anlamlı idi. Tek başına en iyi ayırt edicilik kestirim değeri 0,1091'de %94,3 duyarlılık ve %62,3 özgülüğe sahip olan ve hastalarda hasta olmayan bireylere göre anlamlı olarak yüksek eksprese edilen hsa-miR-98-5p'ye aitti (AUC=0,79). Kombinasyon şeklinde ROC eğrileri değerlendirildiğinde en iyi tanısal performansı miR-98-5p+miR-139-5p kombinasyonu gösterdi (AUC: 0,839, Duyarlılık: %84, Özgülük: % 86,5).

Çalışmada, idiyopatik AAM'li hastalarda adrenerjik beta 3 ve muskarinik 3 reseptör genlerine ait polimorfizmlerin var olduğu fakat bu polimorfizmlerin klinik semptomların oluşmasında etkili olmadığı sonucuna varılmıştır. AAM hastalarında ADRB3 ve ARHGEF10 gen polimorfizmleri, klinik bulguların şiddetini anlamlı olarak değiştirmezken, ROCK2 geninin heterozigot polimorfik yapıya sahip olanlarda hastalığın klinik şiddeti yüksek bulunmuştur. MiRNA analiz sonuçlarına göre, AAM hasta plazmalarında let-7b-5p, miR-92a-3p, miR-98-5p, miR-142-3p, miR-200c-3p ekspresyonları önemli ölçüde artmış ve miR-139-5p ekspresyonu da azalmıştır. Bu miRNA'lar arasında tek başına tanısal performansı en yüksek olan miR-98-5p (AUC=0,79) idi. Tek başına miR-98-5p'nin tanısal performansı etkili olmakla birlikte miR-98-5p+miR-139-5p kombinasyonunun AAM hastalarındaki tanısal performansı her bir miRNA'nın tek başına gösterdiği tanısal performanstan daha yüksekti

(AUC=0,839). Bu sonuçlar bu miRNA'ların AAM hastalarında tanıda etkili yardımcı parametreler olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Aşırı aktif mesane, polimorfizm, mikroRNA



ABSTRACT

Relation of ADRB3, ARHGEF10, ROCK2 gene polymorphisms and miRNAs related to these genes to clinical findings in overactive bladder patients

Dr. Elif FIRAT

In human urinary bladder, adrenergic and muscarinic receptors play an important role in voiding physiology. The function of β 3 adrenergic and muscarinic 3 receptors are important in the pathogenesis of overactive bladder (OAB) syndrome. Single nucleotide polymorphisms have been shown to play a role in the pathophysiology of OAB, in addition to causing various diseases. It has been demonstrated that there are abundant stable microRNAs (miRNAs) in plasma, which can be detected and are potentially disease specific. Alterations in the levels of miRNAs thought to influence the regulation of function of these receptors at the molecular level and may be useful in the evaluation of clinical findings. In the literature, there are very few miRNA studies that may be associated with OAB disease. The aim of this study was to determine the impact of ADRB3, ARHGEF10 and ROCK2 gene polymorphisms on detrusor contraction-relaxation harmony in women with OAB syndrome and investigate whether plasma miRNAs which target these three genes can be used as diagnostic parameters for the detection of OAB.

In this study 60 women with idiopathic OAB and age-matched control women without OAB were enrolled. Genomic DNA was isolated from all patients and subjected to PCR for amplification. The rs4994 polymorphism in ADRB3 gene, rs4376531 polymorphism in ARGHEF10 gene and rs2230774 polymorphism in ROCK2 gene related with muscarinic receptors were detected by qRT-PCR. The expression of let-7b-5p, miR-92a-3p, miR-98-5p, miR-142-3p, miR-200c-3p and miR-139-5p which target β 3 adrenergic and muscarinic 3 receptor genes were examined in plasma by comparing 60 patients with 60 healthy volunteers by quantitative reverse-transcription PCR. Receiver operating characteristics curves (ROC) were generated to evaluate the diagnostic qualification of plasma miRNAs.

The mean weight, height and body mass index in the OAB group were not significantly different from those in the non-OAB group and also we found no

statistically significant difference in the genotype and allele frequencies between the patients and controls for all three SNPs. Genotypic distribution of ADRB3, ARHGEF10 and ROCK2 genes in OAB patients is not different from the control group. While there was no relationship between ADRB3 and ARHGEF10 gene polymorphisms and OAB score in OAB patients, the OAB score in heterozygous polymorphic individuals in the ROCK2 gene was significantly higher than in homozygous polymorphic individuals ($p < 0,05$). Although there was no correlation between the levels of miRNA expression with OAB symptom score, the expression of let-7b-5p, miR-92a-3p, miR-98-5p, miR-142-3p and miR-200c-3p was significantly higher in OAB patients compared to controls. The plasma level of miR-139-5p was significantly lower in OAB patients compared to controls. ROC curve analyzes were significant for all miRNAs. Hsa-miR-98-5p was upregulated in the blood of OAB patients significantly. AUC value of hsa-miR-98-5p was 0.79 (94,3% sensitivity, 62,3% specificity, cut off= 0,1091).

As a result of our study, we found that the polymorphisms of the β -adrenoceptors and related proteins of muscarinic receptor genes were present in both OAB group and healthy subjects, but the polymorphisms were not associated with OAB syndrome. Although the polymorphism of gene in the ADRB3 and ARHGEF10 did not significantly differ the severity of clinical findings, OAB patients also have a heterozygous polymorphic structure of the ROCK2 gene which increases OAB symptom score in muscarinic pathway. The results of this study suggest that let-7b-5p, miR-92a-3p, miR-98-5p, miR-142-3p, miR-200c-3p are significantly upregulated and miR-139-5p is significantly downregulated in the plasma of OAB patients. Among the miRNAs, hsa-miR-98-5p provided the highest diagnostic accuracy (AUC=0,79). Even though the diagnostic accuracy of single miRNA was quite satisfactory, the combination (miR-98-5p+miR-139-5p) is a better indicator for OAB diagnosis due to its higher AUC and as compared with single miRNA (AUC=0,839). These results indicate that these miRNAs can be used as diagnostic parameters for the detection of OAB.

Key words: Overactive bladder, polymorphism, microRNA

GİRİŞ

AAM sendromu, ani sıkışma hissi, sıkışma inkontinansı, sık idrara çıkma ve noktüri gibi semptomlarından biri ya da bir kaçının bir araya gelmesi ile oluşan klinik bir durumdur (1). Toplumda çok yaygın görülür ve yaşam kalitesini ciddi derecede olumsuz etkiler. AAM, kadınlarda %11,6, erkeklerde %9,7 olmak üzere dünya genelinde %10,7 sıklığında bildirilmiştir (2). Ülkemizde Denizli ilinde yapılan çalışmada erkeklerde %20, kadınlarda %35,7 oranında AAM sıklığı bildirilmiştir (3).

İşeme, spinal ve bulbospinal yüksek kortikal merkezlerle afferent ve efferent bağlantıları olan, lumbosakral parasempatiklerle motor eksitator uyarılar ve depolama için sempatik yolların işlev gördüğü kompleks bir süreçtir (4). Bu nörolojik bileşenlerin herhangi birindeki bozukluk AAM semptomlarına sebep olabilir. Semptomları açıklayacak herhangi bir patolojik neden yoktur. Etyolojisi tam olarak ortaya konamamış olan AAM'nin patofizyolojik teorilerinden en güçlüsü mesane detrüsör kası üzerinde kortikal inhibisyonun azalması ve primitif işeme refleksine benzer kasılmaların ortaya çıkmasıdır.

Mesane kasılmaları esas olarak M3 reseptör alt grubunun daha etkin olduğu muskarinik parasempatik (kolinerjik) reseptörler tarafından kontrol edilir. Kolinerjik yolakta, esas nörotransmitter olan asetilkolin salgılanmasından, aktin-miyozinin gevşemesine kadar birçok protein görev alır. Guanin nükleotid değiştirici faktörler (GEF) ve Rho ilişkili kinaz (ROK/ROCK) proteinleri de işeme fizyolojisindeki kolinerjik yolakta yer alan önemli proteinlerdendir. Bu proteinlerin işlevsel bozuklukları düz kasta aşırı kasılmaya sebep olmaktadır (5). Mesane düz kasının gevşemesi $\beta 3$ alt tipinin esas rol aldığı adrenerjik reseptörler tarafından kontrol edilir (1, 4, 6). Bu reseptörün hipofonksiyonu mesane detrüsör kasının gevşemesinin bozulmasına ve idrar yollarında fonksiyon bozukluğuna sebep olur. Bu yolağın araştırılması için yapılan çalışmalarda $\beta 3$ reseptörünü kodlayan ADRB3 geninde rs4994 (T/C) polimorfizmi saptanmış ve bazı çalışmalarda AAM'li hastalarda idrar yollarındaki fonksiyon bozukluğu bu adrenerjik reseptör gen polimorfizmi ile ilişkilendirilmiştir (4, 7-9).

AAM tedavisinin temelini antikolinergik ajanlar oluşturur. Bu ilaç grubunun da otonom sinir sistemi ile olan yoğun ilişkisi yan etkilerinin fazla olmasına sebep olur (10).

Nedeni tam olarak anlaşılamayan hastalıkların mekanizmasında genetik faktörlerin önemli rol oynadığı son yıllarda anlaşılmaya başlamıştır. Özellikle son zamanlarda posttranskripsiyonel aşamada genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde görev alan miRNA'lar dikkat çekmektedir. Birçok hastalık için tanıda yardımcı parametre olarak kabul edilmektedirler. MiRNA'lar posttranskripsiyonel aşamada mRNA'lara bağlanarak mRNA'nın daha çok inhibe olmasını ya da parçalanmasını sağlayarak, oluşan mRNA'nın proteine dönüşmesini engellemektedirler. mRNA'ların % 30'dan fazlası miRNA'lar tarafından düzenlenir. İmmun fonksiyonlar, hücre ölümü, farklılaşması, gelişimi, proliferasyonu ve metabolizmasını da içeren birçok biyolojik olaylar dizisinde görev alırlar (11-15).

Spesifik dokularda tanımlanmış miRNA'lar periferik kanı da içeren farklı vücut sıvılarında da tespit edilebilmektedir. Kanda dolaşan bu miRNA'lar hormon benzeri etkilere sahip olup salındıkları hücrelerden daha uzaklarda da yanıt oluşturabilmektedirler. Ekstrasellüler miRNA'lar hücre-hücre haberleşmesindeki aracı rolü üstlenebilirler (13). Bu nedenle dolaşan miRNA'ların rollerinin anlaşılması, hastalık patogenezi ve klinik seyri açısından önemlidir ve bize bu konularda yeni bilgiler sağlayabilir.

Çalışmamızda, adrenerjik yolakta görevli ADRB3 genindeki rs4994 (T/C) polimorfizmi ile kolinerjik yolakta görevli önemli proteinler olan GEF ve ROCK2 proteinlerini kodlayan ARHGEF10 ve ROCK2 genlerindeki sırasıyla rs4376531 (C/G) ve rs2230774 (G/T) polimorfizmlerinin varlığı ve bunların hastalığın klinik şiddeti ile ilişkisinin olup olmadığı araştırıldı. Literatürde daha önce AAM'li hastalarda yapılmış miRNA çalışması sınırlı sayıda olduğundan, araştırılacak miRNA'lar, targetscan, mirtarbase, microrna.org ve mirDB veri tabanları ADRB3, ARHGEF10, ROCK2 gen bölgelerini hedef alan miRNA'lar olarak tarandı ve tüm sonuçlar içinden bu genlerle ilişkisi en yüksek düzeyde olabileceği kabul edilebilecek 12 miRNA seçildi. MiRNA'lar, ADRB3 gen bölgesi için hsa-let-7b-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-4458 ve hsa-miR-4500; ROCK2 gen bölgesi için hsa-miR-124-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-

142-3p ve hsa-miR-200c-3p; ARHGEF10 gen bölgesi için hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-302a, hsa-miR-302b ve hsa-miR-367-3p olarak belirlendi.

AAM'nin medikal tedavisininin büyük kısmını yan etkileri çok fazla olan antikolinergikler oluşturmakta, yan etkileri nedeniyle hastalar tedaviyi yarıda kesmekte ve bir kısım hasta grubunda tedavi yanıt vermemektedir. Bu üç polimorfizmin araştırılması ile AAM'li hastalarda gereksiz ilaç kullanımının yan etkileri ve tedavi maliyetleri azaltılabilir, daha etkin, seçici ve hasta odaklı tedavi hedefleri ortaya konulabilir. AAM patogenezinde etkili olduğu düşünülen adrenerjik ve muskarinik reseptörlerin fonksiyonunu moleküler düzeyde etkileyen proteinlerin ekspresyonlarında etkili olabileceği düşünülen miRNA'ların düzeylerinin, hasta olmayan kişilerin düzeyleri ile karşılaştırılması klinik durumu değerlendirme ve moleküler hedefe yönelik tedavi geliştirilmesi açısından yararlı olabilecektir. MiRNA'lardaki dizi ve ekspresyon değişimleri mRNA düzenlenmesinin bozulması ile ilişkili olduğundan bu tür bir ilişkinin tespit edilmesi düzensizliğin gen susturulması gibi gen tedavisi yaklaşımlarına ışık tutmasını sağlayacaktır. AAM patogenezinin sorumlu olduğu varsayılan reseptörlerle ilişkili proteinleri sentezleyen genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde görev alan miRNA'ların ekspresyonlarının AAM ile ilişkisini ortaya koyan bir araştırma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu özelliği ile ülkemizde erişkin AAM hastalarında yapılan ilk miRNA çalışmasıdır.

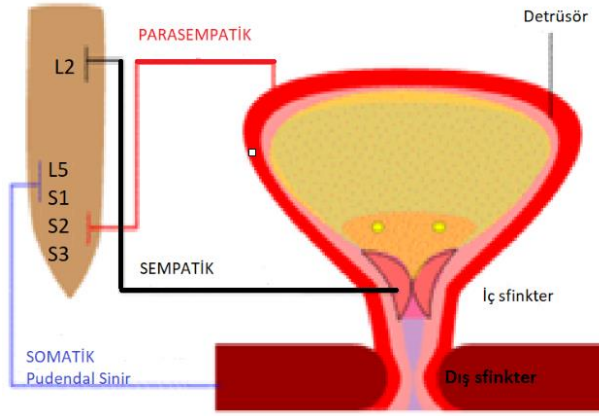
GENEL BİLGİLER

MESANE ANATOMİSİ

İdrar depolamakla görevli olan mesane, anatomik olarak detrüsor kası ve trigon olmak üzere iki temel kısımdan oluşur. Histolojik yapısı içte mukoza, ortada kas, dışta adventisya olmak üzere üç tabakadan oluşur. Ortadaki kas tabakası mesanenin depolama ve gerektiğinde idrarı boşaltma fonksiyonunu yerine getirmesi için esas fonksiyonel tabaka olan detrüsor kasını oluşturur. Detrüsorün birbirlerini çaprazlayan lifleri mesane boynunda dairesel bir özellik kazanarak fonksiyonel bir sfinkter yapısı meydana getirir. İnternal sfinkter kası olarak adlandırılan bu lifler kas ve bağ dokusundan oluşan gerçek bir anatomik sfinkter olmayıp mesane boynu ile proksimal üretranın birleşim yeridir. Submukozal uzanan bu kas lifleri pelvik tabanın uzantısı olan eksternal sfinkter kasına katılır. Eksternal sfinkter (rabdofinkter) istemli kontrol edilebilen çizgili kas liflerinden oluşur. Her iki sfinkterin sinirsel uyarılmasındaki (innervasyon) farklılıklar işeme fizyolojisinde önemlidir (16, 17).

MESANE İNNERVASYONU

Mesane, periferik innervasyon ve bunu kontrol eden merkezi sinir sistemi ile kontrol edilir. Parasempatik, sempatik ve somatik bileşenleri olan bir uyarılması vardır. Parasempatik efferent lifler sakral 2-4 spinal segmentlerden köken alır, pelvik sinir içinde mesaneye ulaşır ve kolinerjik reseptörler üzerinden mesanede kasılmayı sağlar. Sempatik lifler ise torakal 10 ile lomber 2 aralığındaki spinal segmentlerden çıkarak hipogastrik sinir içinde mesane ve üretradaki α reseptörler ile üretral kasları, mesane boynu ve iç sfinkteri kasarken, β adrenerjik reseptörler aracılığıyla detrüsor kasını gevşeterek idrarın depolanmasını sağlar. Somatik lifler sakral 1-3 ve 2-4 segmentlerinden ayrı ayrı köken alır, pudental sinir içinde pelvik taban kasları, perine kasları ve dış sfinktere ulaşarak bu kaslarda kasılmayı artırır. İdrarı tutabilme (kontinans) bu yolların dengesi ile sağlanır (5, 16, 17).



Şekil 1. Mesanenin innervasyonu (18)

İŞEME FİZYOLOJİSİ

İstemli olarak gerçekleşen işeme, depolama ve boşaltma evresi olarak iki evreden oluşur. Depolama evresinde mesane duvarından gelen gerilme ve basınç uyarılarının azlığı döneminde sempatik sistem uyarılmış ve parasempatik sistem baskılanmış durumdadır. Sempatik uyarı yoluyla mesanenin düz kasındaki β adrenerjik reseptörler ile mesane gevşetilir, mesane boynu ve üretradaki az sayıdaki α adrenerjik reseptör etkisiyle çıkış direnci artırılır. Parasempatik düğümlerdeki geçiş engellenerek mesane kasılması baskılanır. Mesane içi basınç düşük tutulur. Depolama fazında dış sfinkter kasının somatik efferent aktivitesi artmıştır. Mesane çıkımı kapalıdır, istemsiz mesane kasılmaları oluşmaz. Normal mesane kapasitesi 400 ile 750 ml arasında değişkenlik gösterirken ilk doluluk hissi 100-200 mL, doluluk hissi 300-400 mL, ağrı ve acil boşaltma hissi olarak tanımlanabilen 'urgency' ise 400-500 mL'de meydana gelir. Mesane içi doluluk 300 mL'yi geçtiğinde sıkışma hissi ile birlikte dış sfinkteri gevşetip detrüsörü kasan refleks yollar aktive olur. Mesanenin dolumu sırasında basıncı periyodik olarak aniden yükselten detrüsör kası kasılmaları gerçekleşir. Bu duruma işeme refleksi denir. Bu refleks özellikle posterior üretrada bulunan ve mesane basıncı yükseldiğinde posterior üretranın da dolması ile uyarılan gerilme reseptörlerinin aktive olması ile ortaya çıkar. Uyarılan reseptörler pelvik sinirler içerisinde bulunan sinir lifleri aracılığı ile omuriliğin sakral segmentine ulaşır. Aynı sinir içerisinde bulunan parasempatik liflerle de yanıt detrüsörde kasılma olarak ortaya çıkar. Mesane çok dolu değilse bu kasılma kısa sürede ortadan kalkar ve detrüsör spontan tonusa geri döner. Mesane doldukça kasılma sıklığı ve şiddeti artar.

Bu şiddet işeme eyleminin istemli olarak meydana gelmesine kadar pudental sinir ve dış sfinkter aracılığı ile baskılanır. Bu baskılama olmadığında işeme eylemi gerçekleşir. Dış sfinkter ve pelvik taban kaslarının kortikal yolla gevşetilmesi ve kortikal merkezin işeme merkezleri üzerinden sempatik aktiviteyi kaldırmasıyla işeme başlar. Parasempatik liflerin aktivasyonu ile muskarinik reseptörler üzerinden detrüör kası kasılması başlar. Yeterli güç ve sürede detrüör kasılması ile iç ve dış sfinkterde yeterince gevşeme ile boşaltma gerçekleşir. Muskarinik reseptörler üzerinden üretral düz kaslar kasılarak üretrayı hem kısaltır hem de açarlar afferent impulsların azalması ve proksimal üretradaki gerilme ve sürtünme reseptörlerindeki deşarjların azalmasıyla işeme merkezleri mesanedeki idrarın bittiğini kabul ederek yeniden depolama (dolma) fazına geçer (10, 16, 17, 19).

AŞIRI AKTİF MESANE VE TANISI

AAM dünya çapında milyonlarca insanın yaşam kalitesini olumsuz etkileyen önemli bir alt üriner sistem patolojisidir. AAM, sıkışma inkontinansı ile birlikte olan ya da olmayan, ani sıkışma hissi (urgency), sık idrara gitme ve noktürinin eşlik ettiği, rahatsız edici bir semptomlar kompleksidir. Ani sıkışma hissi ana semptomdur. Kanıtlanmış enfeksiyon ya da belirgin bir patoloji söz konusu olmamalıdır. Semptomlar anlamlı olmasına karşın hiçbiri tanısal değildir (20-22). Tanı, semptomların varlığını AAM semptom skorlaması, dolun sitometrisi değerlendirmesi, idrar yaptıktan sonra mesanede kalan idrar volümünün (Post Voiding residü=PVR) ölçümü, işeme günlüğü, idrar kültürü değerlendirmeleri ile netleştirilir (23).

AŞIRI AKTİF MESANE PATOFİZYOLOJİSİ

AAM klinik bir tanıdır ve ürodinamik testlerde spontan ya da uyarılmış anormal detrüör kası aktivitesi gözlenir. Detrüör kasta gevşeme azalmış, kasılmalar artmıştır. AAM ve detrüör kası hiperaktivitesinin kesin nedeni ya da nedenleri henüz tanımlanamamıştır. Bu sebeple araştırmalar afferent sinyal anormalliklerine odaklanmış, sebebe yönelik hipotezler ve gözlemler kliniğe uyarlanmaya çalışılmıştır.

AAM'nin patofizyolojisi için üç teori ileri sürülmüştür. Bu teorilerden ilki olan miyojenik (kasla ilgili) teoride istemsiz detrüsör kasılmaları ve kas yapısında olan değişiklikler söz konusudur. Etyolojiden bağımsız olarak detrüsör kasın kısmi denervasyonu hücreler arasında uyarılma ve elektriksel iletişimi artırarak düz kas özelliklerinin değişmesine sebep olur. Detrüörün herhangi bir noktasında oluşacak bir lokal kasılma mesane duvarı boyunca yayılacak ve tüm mesanede koordineli miyojenik bir kasılmaya sebep olacaktır. Kas hücreleri arasındaki bağlantı köprülerinin artması, bağlantı yapılarındaki değişiklikler kasılmanın yayılmasını kolaylaştırır (21, 22). Bütün bu değişiklikler mesane içi basınçta stabil olmayan bir artışa sebep olur. İşeme sırasında da oluşan bu basınç artışı mesane duvarı ve nöronlarda periyodik iskemi sonucu, düz kasta uyarılabilirliği artıran sekonder değişikliklere sebep olabilir (21).

İkinci teori olan nörojenik (sinirsel) teoriye göre ya beyindeki santral inhibitör yollarda ya da spinal kordda hasar sonucu ya da mesane içindeki afferent periferik sinir sonlanmalarının aşırı duyarlanması ile primitif işeme reflekslerinin baskılanmaması sonucu detrüsör kası hiperaktivitesi meydana gelebilir. Beyin hasarı sonucu suprapontin inhibisyonun azalması, spinal kord yaralanması ile aksonal yollarda hasar ve primitif spinal mesane reflekslerinin ortaya çıkması ile afferent C lifleri ve periferik afferent sinir uçlarındaki aşırı duyarlanma ile mesane içinde yeni reflekslerin oluşması sonucu detrüsör hiperaktivitesi oluşabilir. Dolayısı ile Multiple Skleroz, serebrovasküler olaylar ya da Parkinson hastalığı nörojenik kökenli detrüsör hiperaktivitesine sebep olabilir (21, 22). Mesane duvarının subütelyal tabakasında yer alan afferent innervasyonlar son zamanlarda araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Çok sayıda uyarıcı ve inhibitör aracı ve nörotransmitterler ütelyumdan ayrılabilir ve çeşitli özelleşmiş reseptörle etkileşime girebilir ve daha geniş bir nöroaktivasyona yol açabilir. Mesane afferent aktivitesinin regülasyon bozukluğu, reseptör yapılarında olan değişiklikler, mesane efferent yollarında değişmiş işeme sinyaliye yol açar ve sonuç olarak bozulmuş detrüsör kası fonksiyonuna neden olur.

Üçüncü teori ise, detrüsör kasının modüler olduğunu, diğer bir deyişle dairesel kas alanlarından oluştuğunu ileri süren otonom mesane teorisidir. Toplu olarak miyovezikal pleksus olarak adlandırılan her bir kas içi mesane ganglionu ya da

interstisyel hücre düğümü ile innerve edilen alan ayrı bir modül olarak tanımlanır. Düğüm ya da modüllerin aktiviteleri arasında senkronizasyon olabilir ve bu da mesane duvarındaki sinir ya da interstisyel hücre ağları aracılığı ile veya kas hücreleri arasında doğrudan iletişim yolu ile ilerleyebilir. Bu teoriye göre, mesanenin normal dolumu sırasında işlemeye yol açmayan kasılmalar ve otonom bir hiperaktivite söz konusudur. Patolojik durumlarda bu temel mekanizmalarda farklılıklar görülebilir. Sonuçta aşırı miktarda uyarıcı akım ya da inhibitör akımlarda bir yetmezlik oluşması otonom aktivitenin uygun olmayan bir tarzda artıp detrüsör kasının aşırı aktivitesine sebep olur. Bunun dışında, modüller arasındaki iletişimi arttıran her faktör yine detrüsör kasının hiperaktivitesine sebep olabilir (22).

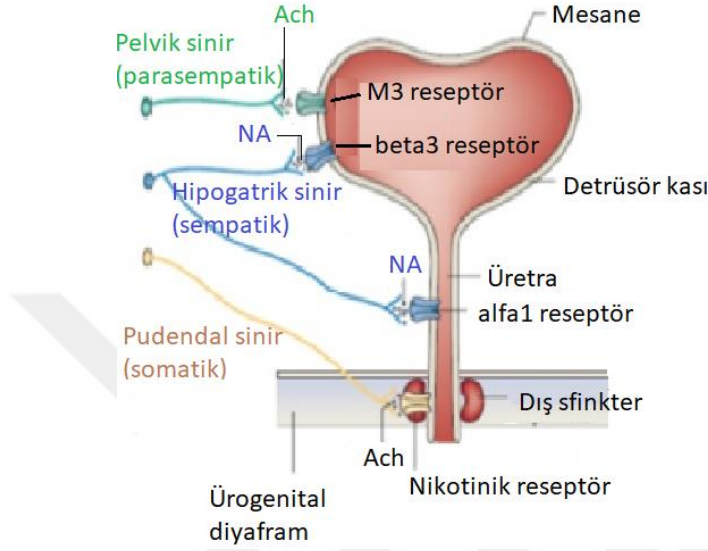
Özetle, AAM ve detrüsör kası aşırı aktivitesinin patofizyolojisinde mesanenin afferent ve efferent sinir iletim yollarında oluşan hasarlar yer alır. Bunlar arasında, afferent uyarıların inhibe edilmesinde azalma, afferent aktivitenin artışı, reseptör proteinlerindeki değişiklikler, kas hücresinde sinyal yollarındaki düzenleme bozuklukları, suprapontin inhibisyonun azalması ve kasılmaya aracılık etmek üzere salınan araçılara karşı duyarlılığın artması sayılabilir. Gerçek sebep bireyler arasında değişiklik gösterebilir. Bir ya da birden fazla sebep hastanın kliniğine sebep olabilir (21, 22).

DETRÜSÖR KASINDA KOLİNERJİK VE ADRENERJİK YOLAKLAR

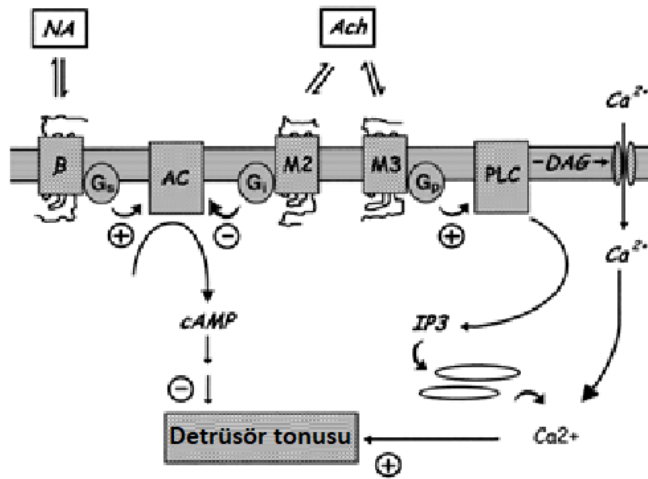
İşeme, içinde nöral devrelerin olduğu bir süreçtir. Beyin ve spinal kord, mesane ve üretra düz kas aktivitesini koordine eder. Bu devreler depolama ve boşaltım evreleri arasında açma kapama anahtarı gibi davranır. Alt üriner sistemin sinirsel kontrolü karmaşık olduğundan çeşitli nörolojik bozukluklar, anormal duyuşsal aktivasyon ve detrüsör kasın kendine ait motor kararsızlıkları gibi durumlar urge inkontinansın (ani sıkışma hissi ile birlikte idrar kaçırma) sebebi olabilir (5).

Alt üriner sistem parasempatik, sempatik ve somatik sistemin oluşturduğu üçlü bir periferik sinir sistemi koordinasyonu ile innerve olur. Nörotransmitterlerin alt üriner sistemdeki etkileri reseptör lokalizasyonu ile ilgilidir. Parasempatik aktivasyon, mesane gövdesinde yüksek oranda bulunan muskarinik reseptörler üzerinden etki ederek detrüsör kasında kasılmaya neden olur ve mesane boşalmasını sağlar. Sempatik

aktivasyon, α adrenerjik reseptörler ile mesane tabanı ve üretrada kasılmaya ve β adrenerjik reseptörler ile mesane gövdesinde gevşemeye neden olarak, mesanenin depolama işlevini sağlar.



Şekil 2. Mesanenin innervasyonu 2 (24)



Şekil 3. Kolinergik ve adrenerjik yolakta ikinci mesajcı sistem (25)

Kolinerjik Yolaklar

Mesane boşalmasından esas olarak parasempatik sistem sorumludur. Parasempatik sinirler spinal kordun sakral çekirdeklerinden köken alır ve pudental sinir ile birlikte mesane düz kasının muskarinik reseptörlerine uzanır. Postganglionik aksonları uyarıcı nörotansmitter olarak asetilkolin (ACH) salgılar. Parasempatik postganglionik nöronlar detrüör kası içinde bulunur ve aktivasyonu ile mesane kasılması, üretral gevşeme görülür. Parasempatik sistemin etkisine aracılık eden muskarinik reseptörler M1, M2, M3, M4 ve M5 olmak üzere beş tiptir. Mesanede M2 alt grubu yoğunluk olarak daha fazla olmasına rağmen asıl kasılma en iyi M3 reseptörleri ile sağlanır. M3 reseptör yoğunluğundan dolayı muskarinik etki ile kasılma en fazla mesane gövdesinde olur. Muskarinik reseptörler üreteriyum, detrüör kası ve parasempatik/semptomatik sinir uçlarında tespit edilmiştir (25, 26). Detrüör kasındaki muskarinik reseptörler G proteini kullanır. Gq üzerinden fosfolipaz C'yi aktive eder. Hücre içi kalsiyum artar ve detrüörde kasılma sağlanır.

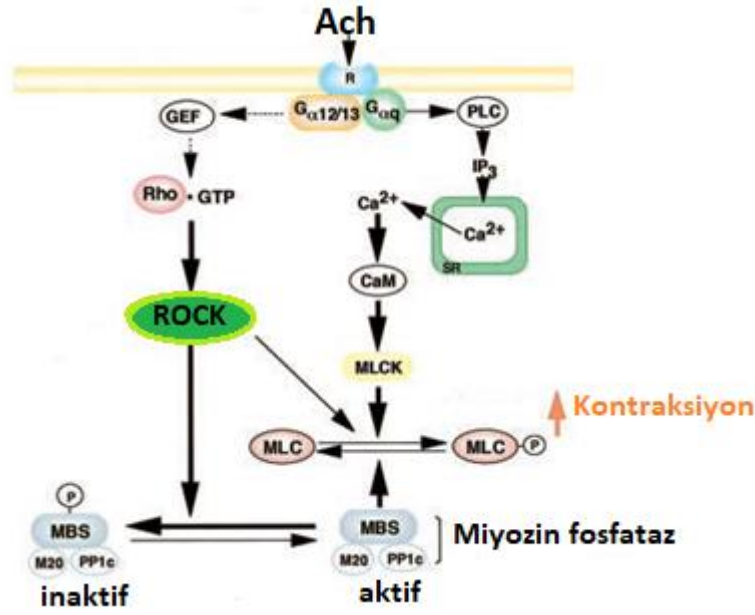
Agonistler guanozin trifosfat (GTP) bağlı proteinlerle kenetli reseptörlere bağlandıklarında fosfotidilinozitol kaskadını aktive eder. Bu kaskadın aktive olması sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum (Ca) serbestleşmesi ile sonuçlanır. Hücre içi Ca artışı Ca/kalmodülün bağımlı miyozin hafif zincir kinazı (MLCK) aktive eder ve miyozinin miyozin hafif zinciri (MLC) fosforile olur. MLC'nin fosforilasyonu miyozin ATPaz'ı aktive eder ve düz kas kasılması gerçekleşir. Yapılan çalışmalar Ras süper ailesinin Rho alt grubunda tanımlanan küçük GTPaz olan Rho'nun agonist ile uyarılan kasılmada gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Moleküler mekanizmaları tam olarak netleştirilememekle birlikte düz kas kasılmasındaki sinyal yolağında Rho, Rho ilişkili kinaz (Rho kinaz/ROK/ROCK) ve miyozin bağlayıcı alt ünite (MBS)'nin kritik rol aldığı gösterilmiştir (27, 28).

Rho, Ras süper ailesinin Rho alt grubunda yer alan monomerik GTP bağlayan bir G proteindir. Diğer G proteinler gibi hem GDP/GTP bağlayan hem de GTPaz aktivitesi gösteren bir proteindir. GDP bağlı inaktif GDP.Rho, hem de GTP bağlı aktif GTP.Rho formları arasında moleküler bir anahtar gibi iş görür. Sadece miyozin temelli kasılma için değil, aynı zamanda aktin hücre iskeletinin dinamik yeniden düzenlenmesi ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi farklı işlevleri yerine

getirmek için, Rho ailesinin kendi özel düzenleyici proteinleri ile birkaç üyesi işbirliği yapmak zorundadır. Rho hücrel etkilerini ROCK ve MBS gibi sayısız özel protein üzerinden gerçekleştirir (27, 28).

Rho ile ilişkili kinazlar bir serin/treonin kinaz özelliğindedir. GTP.Rho bağlayan bir protein olarak tanımlanırlar. $ROK\beta$ /ROCK1 ve $ROK\alpha$ /ROCK2 olarak iki izoformu vardır. ROCK2 izoformunun kalpte ve düz kasta yüksek miktarlarda olduğu tespit edilmiştir. Kasılma sırasında bu proteine ait mRNA ekspresyonunda artış tespit edilmiştir (27, 28).

ROCK'lar, aktin hücre iskeletinin kontrolü ve hücre kasılmasının kontrolü yoluyla hücrel apoptozunun, büyümenin, metabolizmanın ve göçün önemli düzenleyicisidir. Rho, MLC fosforilasyonunu ROCK ve MBS üzerinden gerçekleştirir. MLC'nin fosforilasyonun düz kas kasılmasındaki kritik rolü sırasında defosforile edilmesi fizyolojik olarak gereklidir. Defosforilasyon için görevli miyozin fosfatazın aktif olan bölgesi MBS bölgesidir. ROCK'lar çeşitli hedefleri fosforile eder ve GTPaz-Rho'ya yanıt veren aktin hücre iskeletini de içeren geniş çaplı hücrel tepkilere aracılık eder. G protein reseptöre bağlı aktivasyonu sağlanan Rho, ROCK aktivasyonunu sağlar. Aktive olan ROCK, MBS fosforilasyonunu sağlar ve miyozin fosfatazın aktivitesini inhibe eder. Aynı zamanda ROCK direk olarak o an MLCK'nin fosforile ettiği MLC'yi fosforile eder. Dolayısıyla ROCK, miyozin fosfatazın inaktivasyonu ve direk olarak MLC fosforilasyonu ile düz kas kasılmasının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (27, 28).



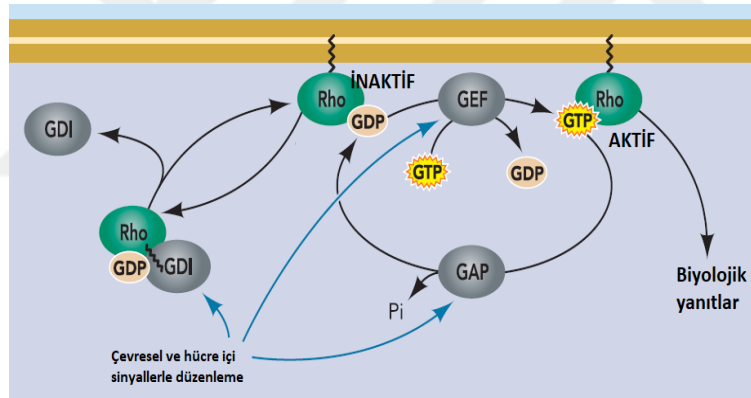
Şekil 4. M3 reseptörü üzerinden detrusör kası kasılmasında görev alan sinyal yolları (27)

Rho ve ROCK sadece Ca duyarlılığını değil, aynı zamanda düz kasın kasılma şeklini tanımlayan düz kas farklılaşma genlerinin ifadesini de düzenlemektedir. Bu genler düz kas aktini, düz kas miyozini ağır zinciri gibi kasılma mekanizmalarının proteinlerini kodlar. Dolayısıyla Rho'nun düzenlenmesi hem kısa vadede kas kasılmasında hem de uzun vadede kontraktıl yapının oluşturulmasında anahtar role sahiptir (28, 29).

ROCK aynı zamanda endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS) ekspresyon ve aktivitesini de düzenler. eNOS aktivitesi sonucu sentezlenen NO, endotelial bütünlükte olduğu kadar siklik nükleotidlerle birlikte düz kas gevşemesinde de görevlidir. Ca duyarlanmasını azaltarak gevşemeye katkıda bulunurlar. Kronik hipoksi ve hücrel proliferasyon Rho-ROCK sinyal iletimindeki değişim ile düz kas gevşemesinde rol alan NO sentezini eNOS aktivasyonunun inhibisyonu ile bozar ve aynı zamanda AAM'de üretelal epitelyum disfonksiyonuna katkıda bulunarak hastalığın patogenezinde etkili olabilir. Aynı zamanda AAM için, anahtar rollerinden dolayı ROCK2'deki bir genetik duyarlılık da hastalık temelinde etkili olabilir (28, 29). ROCK2 geni genomda 2p25.1 sitogenetik bandında bulunur. Gende oluşan rs2230774 polimorfizmi ile 431. bazda guanin/timin (G/T) transversiyonu oluşması treonin yerine

asparajin aminoasidinin sentezlenmesine sebep olur (30). Polimorfik allele sahip genlerin fonksiyonel etkisi düz kasta Rho-ROCK bağlanma afinitesini değiştirip kasılmayı etkileyebilirken, ROCK fonksiyon değişimi sadece kasılma üzerinden değil eNOS ekspresyonunda da değişikliğe sebep olarak kas tonusunu etkileyebilir.

GEF'ler, çeşitli ekstraselüler uyarılara yanıt olarak küçük GTPazları aktive eder ve çok sayıda hücrel yanıtı düzenler. GDP'nin Rho'dan ayrılmasını, GTP'nin de bağlanmasını kolaylaştıran düzenleyici faktörlerdir. Aktin hücre iskeletinin ana düzenleyicileri olarak tanımlanan küçük GTPazlar, kasılma, hücre hareketi, proliferasyon ve apoptozis dahil olmak üzere hücre fonksiyonlarının çeşitliliğini kontrol ederler. Küçük GTPazlar, aktif olmayan GDP'ye bağlı form ile aktif GTP bağlı form arasında geçiş yapan moleküler anahtarlardır. ARHGEF10, GEF ailesinin bir üyesidir. Rho aktivitesini düzenlediği gibi periferik nöronların miyelinizasyonunda da fonksiyon görür (29, 31).



Şekil 5. Rho-GEF etkileşimi (32)

ARHGEF10 geni genomda 8p23.3 lokalizasyonunda bulunur. Bu gende oluşan rs4376531 polimorfizminde 338. bazda sitozin/guanin (C/G) transversiyonu oluşması arjinin yerine treonin aminoasidinin sentezlenmesine sebep olur (33). Bu polimorfizm fonksiyon olarak, bazı transkripsiyon faktörlerinin bağlanma ilgisini değiştirir ve polimorfik alleli olan kişilerde ARHGEF10 transkripsiyonel aktivitesi artar. ARHGEF10'un aşırı ekspresyonu, GTP bağlı Rho'da bir artışa yol açar. Polimorfik allele sahip olanların ARHGEF10 ekspresyonunun daha fazla olması Rho-ROCK

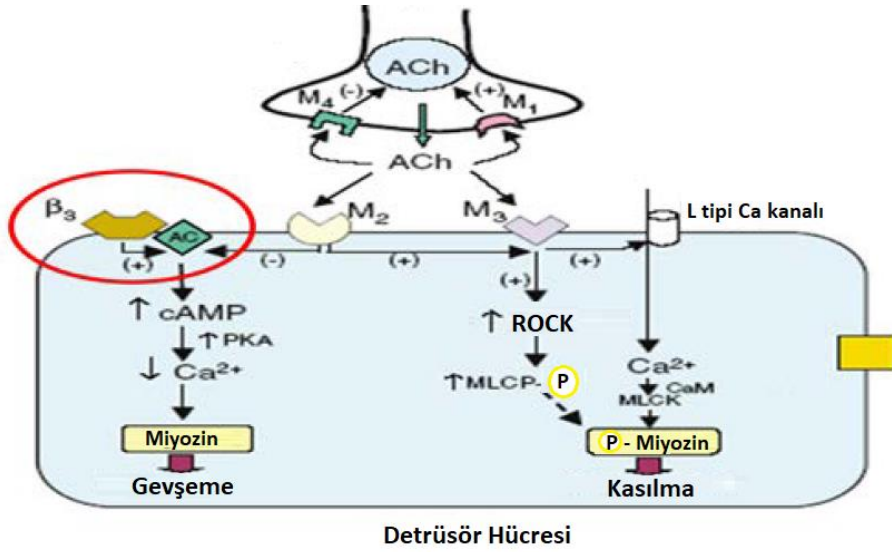
sinyal yolunun artmış aktivitesine yol açabilir ve düz kas kasılmasında artış meydana gelebilir (29, 31).

Bütün bu bilgiler kasılma sırasında kritik öneme sahip Rho, onun düzenleyicisi olan GEF ve ROCK proteinlerinin düz kas kasılmasındaki bozukluklara bağlı hastalıkların patogenezinde rol alabileceklerini ve tedavi hedefi olarak kullanılabileceklerini düşündürür.

Genetik çalışmalar Rho-ROCK sinyal iletiminde bilinmeyen moleküler etkilerin aydınlatılmasında ve genotip özelliklerini esas alarak kişiye özel tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde yararlı bilgiler sağlayacaktır.

Adrenerjik Yolaklar

Sempatik sinirler spinal kordun lomber çekirdeklerinden çıkar ve hipogastrik sinir içinde alt üriner sistemde noradrenerjik reseptörlere ulaşır. Postganglionik nöronları terminal uçlarından norepinefrin salgılayarak mesane tabanı ve üretra düz kasında kasılma ile mesane gövdesinde gevşemeyi sağlar. Adrenerjik reseptörler α ve β reseptörlerdir. α reseptörler mesane çıkışı kasılmalarını kontrol eder ve patolojik durumlarda sayılarının artışı ile birlikte adrenerjik α reseptör aracılı kasılmaların arttığı bilinmektedir. Mesane düz kasında iki çeşit β reseptör bulunur. Bunlar β_2 ve β_3 reseptörlerdir. β_2 adrenerjik reseptörler adenilat siklaz aktivasyonu ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) birikiminin protein kinaz A'yı aktive etmesi aracılığıyla detrüör kası gevşemesinde önemli bir role sahip olsa da β_3 reseptör alt tipinin mesanede ekspresyonunun daha fazla olması gevşemede β_3 reseptör alt tipini öne çıkarır (5, 34).



Şekil 6. Detrüsörde β_3 reseptör aracılı gevşeme mekanizması (35)

β_3 adrenerjik reseptörler düz kas ve adipoz doku başta olmak üzere birçok dokudaki etkisini gevşeme ya da termogenez üzerinden gösterir. Özellikle mesanede düz kas tonusunun düzenlenmesinde ana role sahiptirler (8, 36). β_3 reseptör proteinini 8p11.23 lokalizasyonunda bulunan adrenerjik reseptör β_3 (ADRB3) geni tarafından kodlanır (37). Bu gende 20 yıl kadar önce yanlış anlamlı bir varyant olan Trp64Arg (rs4994) tek gen polimorfizmi saptanmıştır. Gende reseptör proteinini kodlayan 64. pozisyondaki bazda T/C transisyonu oluşması triptofan yerine arginin aminoasidinin sentezlenmesine sebep olarak reseptörün norepinefrine olan afinitesini değiştirir. Reseptör hipofonksiyonel bir varyantına dönüşür. Polimorfik allelin cAMP yanıtını azalttığı ve gevşemeyi olumsuz yönde etkileyerek AAM kliniğine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (4, 8, 9).

AŞIRI AKTİF MESANE TEDAVİSİ

AAM için güncel tedaviler davranışsal tedavi, farmakolojik tedavi, minimal invaziv prosedürler ve diğer cerrahi seçenekleri içerir. Her ne kadar oral antimuskarinikler farmakolojik tedavide başrolde olsa da ağız kuruluğu ve kabızlık gibi rahatsız edici antikolinergik yan etkilerin yüksek insidansı hastaların tedaviye devamlılığını engellemektedir. Bu yan etkilerin tolere edilememesi tedaviye uyumun

bozulmasında en önemli etkidir (38). Bununla birlikte bazı AAM hastaları antimuskariniklere karşı dirençlidir. Hangi hastalarda antimuskariniklerin başarısız olacağını önceden öngörebilsek hastaların gereksiz ilaç kullanımını ve potansiyel yan etkilere maruz kalmalarını engelleyebiliriz. Fakat hangi hastalarda antimuskarinik tedavinin başarısız olacağı sorusu hala cevaplanamamaktadır. Bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (39). Bu sebeplerden dolayı farmakolojik tedavi, yan etkileri daha az ve etkinliği yüksek ajanlara yönelmiştir. Adrenerjik β_3 reseptör agonistleri son yıllarda tek başına ya da antikolinerjiklerle birlikte tedaviye dahil edilmiştir (40-43). Tedavide antimuskariniklerle karşılaştırıldığındaki etkililik düzeyi hala tartışmalıdır (44).

AAM fizyopatolojisinin hala tam olarak aydınlatılamaması ve tedavi protokollerindeki soru işaretleri tanıda yeni yardımcı testlere ve yeni tedavi stratejilerine olan ihtiyacı artırmıştır.

MİKRORNA

Ökaryotik genomik DNA'nın %90'ı transkripsiyona uğrar. Transkripsiyona uğrayan RNA'nın ise sadece %1-2'si proteine dönüşür. Proteine dönüşmeyen RNA'lara kodlamayan RNA (ncRNA) adı verilir. NcRNA'lar organizmada kompleks işlevlere sahiptir. Çok sayıda tipi bulunan ncRNA'lar, yapısal ve düzenleyici ncRNA olarak ikiye ayrılır. Yapısal ncRNA'lar ribozomal, taşıyıcı, küçük nükleer RNA olarak tüm hücrelerde bulunurken, gen ifadesinin düzenlenmesinde görev alan düzenleyici ncRNA'lar ise nükleotit (nt) sayılarına göre uzun ncRNA (>200nt) ve kısa ncRNA (<200nt) olarak iki alt sınıfa ayrılır (45). MiRNA'lar kısa ncRNA grubunda bulunur (46).

MiRNA'lar, genom üzerinde intron ve/veya ekzon genlerinden transkripsiyonu sağlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir. Kısa, tek zincirli, 19-25 nükleotid uzunluğunda olup daha çok memelilerde, mantarlarda ve bitkilerde bulunurlar. Gen ekspresyonunu posttranskripsiyonel olarak mRNA'nın 3' untranslated region (UTR), kodlanan sekanslar ya da 5' UTR bölgesine bağlanarak ya hedef mRNA'nın parçalanması ya da

inhibe olması ile düzenleme sağlarlar. Protein kodlayan genlerin %30'u bu şekilde miRNA'lar ile düzenlenir (12, 15, 47).

Genomda miRNA Geni

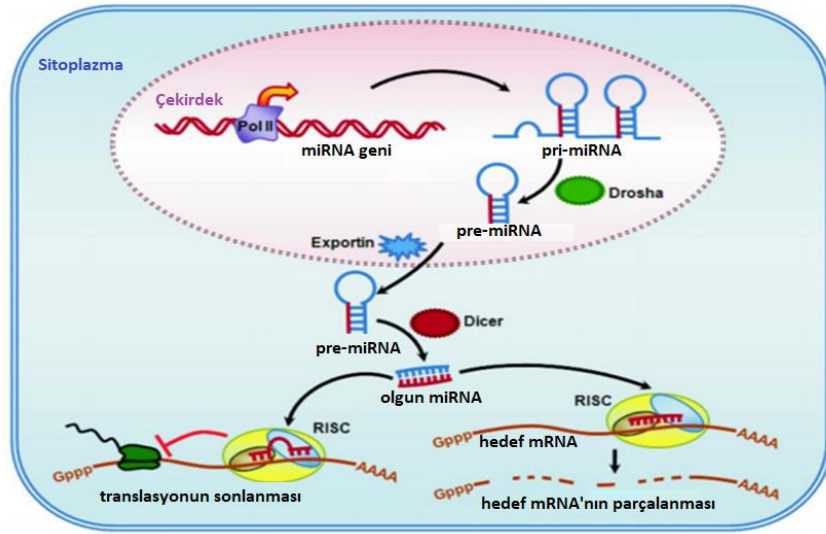
MiRNA genleri Y kromozomu dışındaki tüm kromozomlarda hem kodlanan hem de kodlanmayan transkripsiyon bölgelerinde yerleşiklerdir. Genomik yerleşimlerine göre miRNA'lar intergenik ve intragenik olarak sınıflandırılabilir. İntergenik miRNA'lar; intronik, ekzonik ve mixed (intronik-ekzonik) yerleşimli olabilirler. İntrogenik miRNA'lar buldukları genin aynı zinciri üzerinde yerleşirken bir kısmı da karşı zincirde yerleşir.

Bir miRNA geninin genomik dağılımı ve kromozomal yerleşimi onun ekspresyonunu belirleyen bir faktör olması bakımından önemlidir. MiRNA genlerinin yaklaşık %60'ı transkripsiyon birimlerinin intronlarında yerleşmiştir ve ekspresyonu ev sahibi genlerin ekspresyon profili ile bağlantılıdır. MiRNA'ların ekspresyonu dinamiktir (12).

MiRNA Biyogenezi

MiRNA'lar birbirini izleyen üç aşamada meydana gelir. İlk önce miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci aşamada nükleus içinde pri-miRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara dönüştürülür. En son olarak da sitoplazma içinde olgun miRNA'lar oluşur. MiRNA'lar, çekirdekte primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Pri-miRNA (500-3000 baz), " 5' 7 metil guanozin cap" ve " 3' poli A" kuyruğuna sahip sap ve ilmik yapısındadır. Tek iplikçikten oluşan pri-miRNA kendi üzerinde kıvrılarak saç tokası (hairpin) şeklini alır. Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (veya DGCR8- Di George Syndrome Critical Region 8), tarafından yaklaşık olarak 60-110 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür. Bir nükleaz olan Drosha ile çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha'nın oluşturduğu komplekse mikro işlemci kompleks (Mikroprocessor complex) adı verilir. Pre-miRNA molekülü bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP' ye

bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır. Sonrasında, pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ve kofaktörü human immunodeficiency virus transactivating response RNA binding protein (TRBP) ile saç tokası yapısı kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda uçlarında 2 nt'lik çıkıntı kalacak şekilde çift zincirli miRNA'ya (miRNA dubleks) çevrilir. Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. Dicer, pre-miRNA'nın sap-ilmliğini kestikten sonra miRNA dubleksinden, RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan argonatın etkisiyle 5' ucu daha kararlı olanı seçilip sadece biri miRNA RISC kompleksine katılır. Bu iplik, kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılırken diğer iplik anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır (mir-3p/mir-5p). Bu seçim genellikle termodinamik özelliklere göre yapılır. Yolcu iplik RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. Genel olarak miRNA'lar, RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya argonat proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olarak fonksiyon görürler (12, 15, 47).



Şekil 7. Tipik miRNA sentez yolağı (12)

MiRNA Fonksiyonları

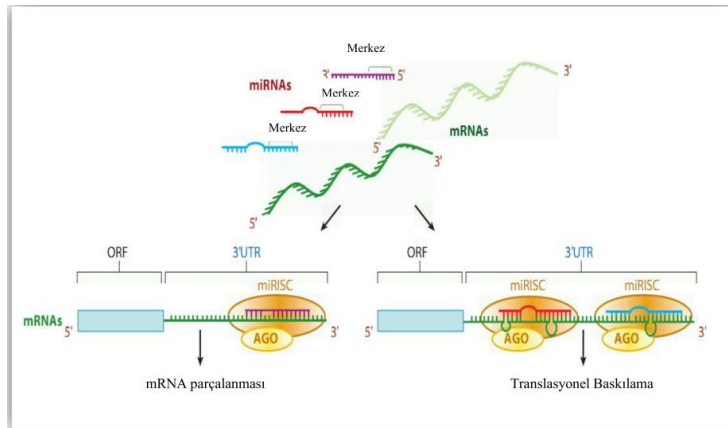
MiRNA'lar organizmada birçok düzenleyici fonksiyona sahiptir. Hüresel, biyolojik ve patolojik süreçlerde farklılaşma, proliferasyon, apoptozis, progresyon, yaşlanma gibi evrelerinin yönetiminde önemli rolleri vardır. mRNA'nın stabilitesini

ve translasyonunu yöneterek karsinogenez, immün sistem, metabolizma, inflamasyon, hücre siklus kontrolü, viral replikasyon, kök hücre farklılaşması gibi önemli süreçlerde görev alır, dokuya özgün bir ekspresyon düzeni gösterirler. Buldukları dokunun farklılaşması ve fonksiyonu üzerinde önemli role sahiptirler. Bu özellikleri ile birçok hastalık için belirteç olabilme ihtimalleri üzerinde durulmaktadır (15).

MiRNA Gen Düzenlenmesi

Memelilerde transkripsiyonun ~%60'ından fazlası miRNA'ların kontrolü altındadır. Bu miRNA'ların ~%30-50'si protein kodlayan genlerin intronlarından kodlanırken geriye kalanlar ise intergenik bölgelerde yer almaktadırlar. MiRNA'lar tipik etkilerini gen ekspresyonu üzerine negatif, inhibitör aktivite ile gösterirler fakat bununla birlikte son yapılan çalışmalar gen ekspresyonunu pozitif yönde de etkilediğine dair sonuçlar da ortaya koymuştur (15).

Gen düzenlenmesi üzerine negatif etkileri çoğunlukla mRNA'nın 3' UTR'sine bağlanarak, daha azınlıkta 5' UTR, ORF (open reading frame- proteine çevrimi yapılan kodlanan diziler) ya da promotör bölgelerine bağlanarak oluşur. MiRNA'ların "çekirdek dizisi" olarak ifade edilen 2-8 nt uzunluğundaki ana dizileri hedef mRNA'ya tam komplementerlik göstererek bağlandıkları için büyük önem taşır. Ayrıca, miRNA'ların her biri birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebilir ve mRNA'ların her birinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği bilinmektedir (12, 15).



Şekil 8. MiRNA ve hedef mRNA eşleşmesi (48)

Mükemmel eşleşme sonucu oluşan inhibisyonda mRNA, miRISC kompleksi ile parçalanır. Parsiyel eşleşme sonucu oluşan inhibisyon pretranslasyonel, kotranslasyonel ya da postinisyasyon mekanizmalarıyla oluşur. Pretranslasyonel süreç daha çok DNA metiltransferaz, histon deasetilaz gibi epigenetik düzenleyicilerle ilişkilidir. Örneğin miR-29 ailesi akciğer kanserinde DNA metiltransferazı hedef olarak tümör süpresörlerin baskılanmasına sebep olur. Kotranslasyonel susturma mRNA parçalanması ya da translasyon inhibisyonuna sebep olur. Postinisyasyonel basamaklarda AGO proteini ribozomun büyük ünitesinin birleşmesini ve elongasyon faktörlerini etkileyerek protein sentezinin bozulmasına sebep olur.

Gen düzenlenmesi üzerine pozitif etkileri doğrudan ve dolaylı olarak görülür. Promoter bölgeye bağlanma ile doğrudan; AGO, FXR1 (Fragile X mental retardation protein 1) gibi proteinler üzerinden de dolaylı olarak transkripsiyonu tetikleyebilirler (12).

Gen düzenlenmesindeki kilit rolü miRNA'ları fizyolojik ve patolojik süreçlerin önemli bir noktası haline getirmiştir. Bozulmuş miRNA ekspresyonu hedef mRNA ekspresyonunu değiştirerek kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar gibi birçok patolojik süreçte önem kazanır. MiRNA profilleri, erken teşhis, sınıflandırma, prognostik ve prediktif biyolojik belirteçler olarak yararlıdır. Erken teşhis biyolojik belirteçleri olarak, bir hastalığın başlangıcını gösterirler ve sıklıkla hastalıkta rolü vardır. Sınıflandırma biyolojik belirteçleri olarak, miRNA'ların ekspresyon paternleri, sağlıklı hücrelerin doku orijinini tanımlar. Az sayıda miRNA'nın tespit edilmesinin, tümörlerin gelişimsel evresi hakkında daha fazla sayıda mRNA'nın tespit edilmesinden daha fazla bilgi sağladığı bulunmuştur. Prognostik biyolojik belirteçler olarak, miRNA'lar bir hastalığın gidişatının tahminini sağlar. Son olarak, öngörücü biyolojik belirteç olarak, hastaların tedaviden elde edebilecekleri faydanın değerlendirilmesi ve izlenmesine izin verir. MiRNA profillerine dayanarak radyoterapi ve kemoterapi tedavilerinde tedaviye cevabın değerlendirilmesinde fikir verir. MiRNA'lardaki dizi ve ekspresyon değişimleri mRNA düzenlenmesinin bozulması ile ilişkili olduğundan bu tür bir ilişkinin tespit edilmesi düzensizliğin gen susturulması gibi gen tedavisi yaklaşımlarına ışık tutmasını sağlayabilir (15).

GEREÇ VE YÖNTEM

ÇALIŞMA GRUBU

Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen katılımcı sayısı güç analizi yöntemi ile belirlendi.

Hasta Grubu

Mart 2017 – Kasım 2017 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Üroloji Ana Bilim Dalı tarafından AAM semptomları ile birlikte AAM semptom skoru >8 olan ve İdiyopatik AAM tanısı konulan 18 yaş üstü 60 kadın hasta çalışmaya dahil edildi. Hasta grubuna, hastalık derecesini belirlemek için Türkçe valide edilmiş AAM formu (EK-1) uygulandı. Doldurulan formlardan AAM semptom skorları hesaplandı.

Nörojenik mesane, mesane çıkım tıkanıklığı ve taş, tümör gibi üriner sistem hastalıkları veya enfeksiyonu, uzun QT sendromu, ciddi karaciğer yetmezliği, böbrek yetmezliği, miyostenia gravis, glokom, ülseratif kolit gibi otoimmün bir hastalık ve alt üriner sistem fonksiyonlarını etkileyecek ilaç kullanılması dışlama kriterleri olarak alındı.

Kontrol Grubu

Kontrol grubu, hasta grubuna yaş ve cinsiyet olarak benzer, klinik şikayet ve bulgusu olmayan, sağlıklı 60 bireyden oluşturuldu.

Etik kurul onayı

Çalışma öncesi 07.03.2017 tarih ve 04 sayı no ile Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu onayı alındı. Ayrıca çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılara “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” ile yapılacaklar hakkında bilgi verildi ve gönüllü olduklarına ilişkin imzaları alındı.

KULLANILAN MALZEMELER VE CİHAZLAR

Kullanılan Cihazlar

- Masa üstü santrifüj (NF 1215, Nüve, Türkiye)
- Masa üstü mikrosantrifüj (1-14K, Sigma, Almanya)
- -20 °C derin dondurucu (Vestel, Türkiye)
- -80 °C derin dondurucu (FR 490 Nüve, Türkiye)
- +4 °C buzdolabı (Vestel, Türkiye)
- Kuru blok termostat (Bio TDB-100, Biosan, Letonya)
- Nükleik asit saflık tayin edici (Nano, Maestrogen, Tayvan)
- Labcycler (Sensoquest, Almanya)
- Step One Plus Real-Time PCR cihazı (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Kullanılan Sarf Malzemeleri

- EDTA'lı kan alma tüpleri (BD Diagnostics, ABD)
- Ayarlanabilir otomatik pipet seti (1-10 µL, 0,2-2 µL, 2-20 µL 20-200 µL, 100-1000 µL) (Thermo Scientific, ABD)
- 0,5-10 µL, 10-200 µL, 100-1000 µL'lik pipet uçları (ISOLAB, Almanya)
- 0,2 mL ve 1,5 mL'lik Eppendorf mikro tüpler (ISOLAB, Almanya)
- 96'lık PCR plate (Mingji, China)
- Plate kaplayıcı seal (Qiagen, ABD)
- İsoopropanol
- Etanol

Kullanılan Kitler

- Exgene™ Clinic SV mini (GeneAll Biotechnology, Korea, Kat. No: 108-101)
- miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Almanya, Kat. No: 217204)

- miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, ABD, Kat. No:339340)
- TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Fast Probe Master Mix (Biotium, ABD)
- miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen, ABD, Kat. No:339347)
- miRCURY LNATM miRNA PCR Assays (Qiagen, ABD)

ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE ANALİZE HAZIRLANMASI

Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılardan 2 ml'lik EDTA'lı 2 tüpe, biri DNA izolasyonu diğeri RNA izolasyonu için kullanılmak üzere venöz tam kan alındı. Hasta ve kontrol gruplarından alınan venöz tam kanlardan bir tüpü DNA izolasyonu yapılana kadar -20 C^0 'de saklandı. RNA izolasyonu için alınan tüp $+4\text{ C}^0$ 'de 3000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra plazma kısmı 1,5 ml'lik steril ependorfa alındı. Ependorfa alınan plazma $+4\text{ C}^0$ 'de 16000 g'de ikinci kez santrifüj edildi. Elde edilen plazmalar RNA izolasyonu yapılana kadar -80 C^0 'de saklandı.

PERİFERİK KANDAN DNA VE RNA ELDE EDİLMESİ

DNA İzolasyonu Protokolü

DNA izolasyonu, ExgeneTM Clinic SV mini (GeneAll Biotechnology, Korea, Kat. No: 108-101) kiti kullanılarak kit protokolüne göre yapıldı. -20 C^0 'de saklanan tam kan örnekleri izolasyon için oda sıcaklığına getirildikten sonra her bir örnekten 200 µl tam kan steril 1,5 ml'lik ependorflara transfer edildi. Her örnek transfer sonrası 20 µl Proteinaz K solüsyonu ile muamele edildi. Hazır bulunan BL tamponu her tüpe 200 µl hacimde eklendi. Karışım vortekslendikten sonra 10 dk 56 C^0 'de inkübe edildi. Santrifüjler oda ısısında gerçekleştirildi. Kapakta damla kalma ihtimalini ortadan kaldırmak için kısa santrifüj yapıldı. Sonrasında %100'lük 200 µl etanol her tüpe eklendi ve vortekslendi. Kısa süre santrifüjlenen karışımların süpernatant kısımları SV

kolonlara transfer edildikten sonra >6000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Kolonların altındaki tüpler atıldı ve steril olanlarla değiştirildi. Kolonların üzerine 600 µl BW tamponu eklendikten sonra >6000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Kolonların altındaki tüpler tekrar yenileriyle değiştirildi. Kolonlara 700 µl BW tamponu eklenip >6000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve tüpler değiştirildi. Yıkama solüsyonlarından tamamen temizlenmeleri için son hızda (16000 g) 1 dk santrifüj edildikten sonra kolon tüpleri tekrar steril olanlarla değiştirildi. Son olarak kolonlara 200 µl AE tamponu eklendikten sonra 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilen tüpler en yüksek hızda 1 dk santrifüj edildi ve DNA izolatları elde edilmiş oldu. Total DNA konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrik yöntemle nanodrop (Nano, Maestrogen, Tayvan) cihazında ölçüldü. Tüm örneklerin konsantrasyon, A260, A280, A260/280 değerleri kaydedildi. Her bir örneğin stok konsantrasyonu hesaplandı. İzole edilen DNA'lar RT-PCR cihazında SNP analizleri yapılmak üzere +4 C⁰ 'de saklandı.

RNA İzolasyonu Protokolü

Plazmadan miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Almanya, Kat. No:217204) ile RNA izolasyonu kit protokolüne göre yapıldı. RNA izolasyonu için -80 C⁰ 'de saklanan plazma örnekleri hızlıca 37 C⁰ 'de su banyosunda çözdürüldü. Bundan sonraki tüm basamaklar oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Gerekli örnek hacmi olan 200 µl plazma, 2 ml'lik steril ependorflara kondu. Her bir örneğin üzerine 60 µl RPL tamponu eklendi. Karışım >5 sn vortekslendikten sonra 3 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında her tüpe 20 µl RPP tamponu eklendi ve >20 sn kuvvetlice vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi. Oda sıcaklığında 12000 g'de santrifüj yapıldı ve tüp üzerinde kalan renksiz ve berrak süpernatantlar yeni steril reaksiyon tüplerine transfer edildi. Süpernatantla aynı miktarda izopropanol tüplere ilave edildi ve vorteksle karıştırıldı. Oluşan karışım RNeasy UCP MinElute kolonlara transfer edildikten sonra 15 sn >8000 g'de santrifüj edildi. Kolon altındaki tüpler süzülen kısım ile birlikte atılıp yenileriyle değiştirildi. Kolonlara 700 µl RWT tamponu eklendi ve 15 sn >8000 g'de santrifüj edildikten sonra altta kalan kısım tüplerle birlikte atılarak yeni tüplerle değiştirildi. 500 µl RPE tamponu eklendikten sonra aynı işlem tekrarlandı. Sonrasında kolonlara 500 µl %80'lik etanol eklendi ve 2 dk >8000 g'de

santrifüj edildi. Altta kalan kısım atılarak kolonlar yeni steril tüplere yerleştirildi. Tüpler solüsyon eklenmeden membranları arındırmak için en yüksek hızda 5 dk santrifüj edildi. Kolon altında kalan tüpler tekrar değiştirildikten sonra her kolona 20 µl RNase-free su konuldu, 1 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrasında tüpler 1 dk en yüksek hızda santrifüj edilerek RNA izolasyonu tamamlandı. Total RNA konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometrik yöntemle nanodrop (Nano, Maestrogen, Tayvan) cihazında ölçüldü. Tüm örneklerin konsantrasyon, A260, A280, A260/280 değerleri kaydedildi. Her bir örneğin stok konsantrasyonu hesaplandı.

CDNA ELDESİ

İzole edilen RNA'lerden miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, ABD, Kat. No:339340) ile reverse/ters transkripsiyon (RT) işlemi uygulanarak daha stabil olan cDNA elde edildi. Tüm basamaklar buz üzerinde gerçekleştirildi. İnkübasyon basamakları için Labcycler (Sensoquest, Almanya) cihazı kullanıldı.

Tablo 1. RT için reaksiyon içeriği

5x miRCURY RT Reaction Buffer	2 µl
RNase-free water	5 µl
10x miRCURY RT Enzyme Mix	1 µl
RNA	2 µl
Toplam hacim	10 µl

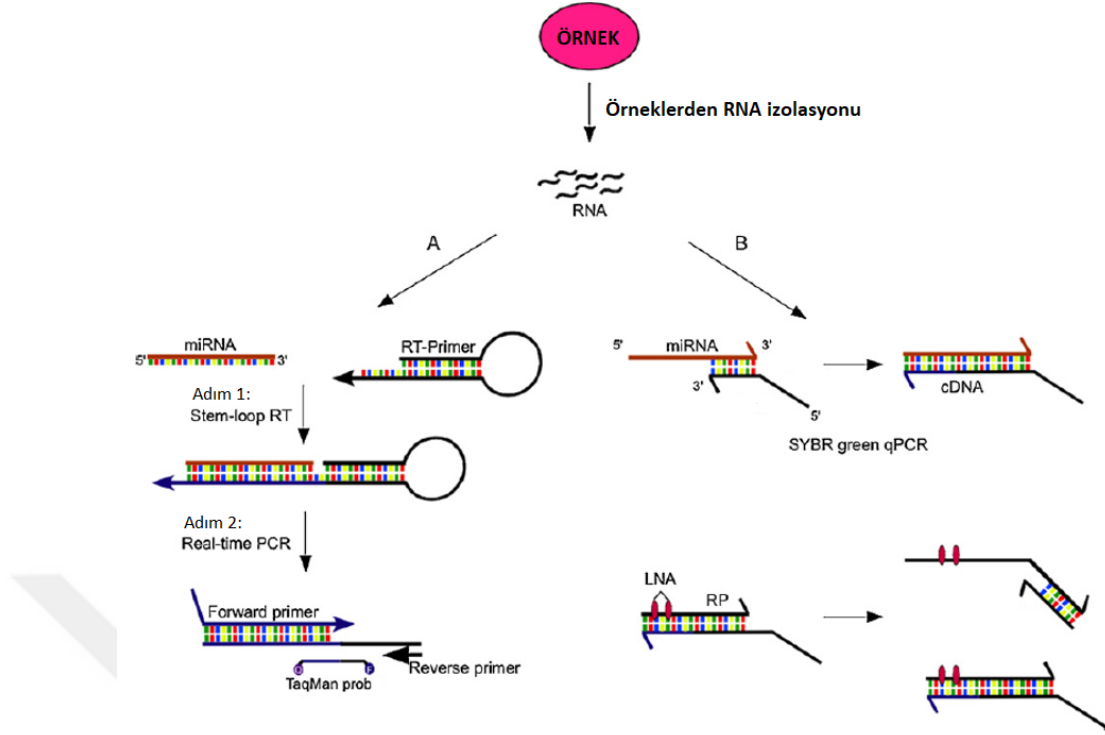
Tablo 2. RT sıcaklık protokolü

RT Basamağı	60 dk	42 C ⁰
Reaksiyonun Edilmesi	İnaktive 5 dk	95 C ⁰
Örneklerin Saklanması	∞	4 C ⁰

GERÇEK ZAMANLI (Real Time)-PCR METODU

Gen ekspresyon miktarını belirlemede altın standart olan kantitatif reverse transkriptaz gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), düşük düzeyli miRNA miktarlarını da belirlemede sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Aynı zamanda mikroarray ile genom profileme analizlerinin onaylanması amacıyla da kullanılır. Gen ekspresyonlarının farklılıklarının belirlenmesinde, SNP analizinde yüksek oranda uygun ve güvenli değerlendirme sağlayan çok duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Aynı anda birden fazla miRNA ölçümü yapabilmesi yöntemin avantajlarından. Hızlı, basit, ucuz, veri analizi kolay, duyarlı ve özgül olmasıyla rutin laboratuvarlarda kullanılabilir bir yöntemdir. Klinik pratikte erken tanı, hastalıklarda progresyon tayini, kanser sınıflandırması, hastalıktan sorumlu RNA'ların belirlenmesi, tedavi etkinliğinin takibinde çok yardımcı bir yöntemdir.

Real-time PCR hedef RNA'nın kendi cDNA'sına revers transkripsiyonu ile başlar. Daha sonra gen spesifik primerler kullanılarak çoğaltılan RNA miktarı ölçülür. Revers transkriptaz enzimi hedefin poli A kuyruğu üzerinden ters transkripsiyona başlar. cDNA'nın sentezlenmesinden sonra TaqMan prob ya da SYBR Green yöntemi ile analiz gerçekleştirilir. Fakat miRNA'larda poli A kuyruğu yoktur. Bunun için stem-loop (kök-halka) yöntemi kullanılır. Bu yöntemde primerler 5' ucunda miRNA'nın 3' ucuna bağlanabilecek stem-loop yapı içerirler. Primerler miRNA'nın 3' ucuna bağlanır ve kendi yapısındaki stem loop şekli ile 3' ucunun uzamasını sağlar ve revers transkripsiyonu başlatır (49-51).



Şekil 9. TaqMan ve SYBR Green RT-PCR basamakları (49)

Taqman prob kullanan yöntem “dual labeled probe” veya “5' nuclease probe” olarak da adlandırılır. TaqMan probe yöntemi çoğaltılmak istenen DNA'ya komplementer olan ve floresanla işaretlenmiş tek zincirli prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” ve 3' ucunda “quencher” boya vardır. 3' uçtaki baskılayıcı boya 5' uçtaki florofor boyanın sinyal oluşturmasını engeller. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde bağlanma bölgelerine primerler ve TaqMan problar bağlanır. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesi ile florofor boyayı probdan ayırır. Serbest hale geçen florofor sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün arttıkça floresans da ona bağlı olarak artmaya devam eder. TaqMan probe yönteminde polimorfizm tespiti ile birlikte sayısal değerlere de ulaşılabildiğinden araştırmacılar için avantaj sağlar. Bu yöntem standart bir protokolle, kolay bir dizaynla ve çok az bir

optimizasyonla gerçekleştiği için hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profilinin çıkartılmasında kolaylıkla kullanılır (52).

SYBR Green kullanan yöntemde önce miRNA, 3' ucuna poli A polimeraz ile bir poli A kuyruğu eklenerek uzatılır. Bu tek zincir, universal oligo dT primerler kullanılarak revers transkripsiyona uğrar. Sonuçta oluşan cDNA her bir miRNA'ya özel bir forward primer ile universal revers primer kullanılarak çoğaltılır (amplifikasyon). Amlifikasyon sonrası oluşan çift zincirli DNA'lar arasına giren SYBR Green boyasının floresans miktarı ile miRNA miktarı tayin edilir. Burada kullanılan forward primerler LNA (locked nükleik asit) kullanılarak hazırlanmış kimyasal yapılarındaki değişiklikler ile hedefe çok spesifik bağlanabilen, yeni bir sınıf oligonükleotid yapıda RNA analoglarıdır (50).

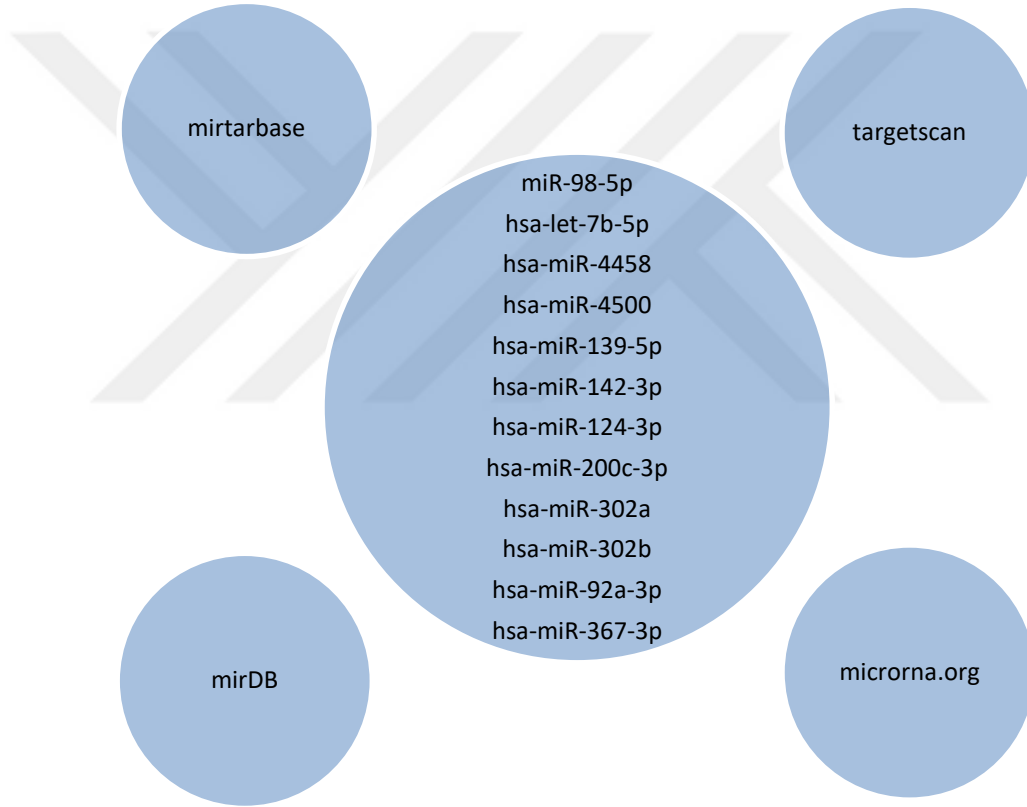
GENOTİPLEMESİ YAPILACAK SNP SEÇİMİ

AAM patofizyolojisinde yer aldığı dşnlen sinyal yolaklarındaki fonksiyon değişikliklerinin altında yatan mekanizma olan adrenerjik yolaktaki sinyal iletiminde azalma ve kolinerjik yolaktaki sinyal iletimindeki artıştan sorumlu olabileceği dşnlen adrenerjik reseptör proteinini kodlayan ADRB3 geninde daha önceki çalışmalarda da değerlendirilen Trp64Arg rs4994 T/C polimorfizmi ile, muskarinik reseptörlerle aktive olan ve düz kas kasılmasını indükleyen Rho-Rho kinaz sinyal yolağında aktivasyon artışına sebep olabileceği dşnlen, erişkin AAM hastalarında daha önce değerlendirilmemiş, düz kas kasılmasındaki patogeneze kaynaklı diğer hastalıklarda çalışılmış, Rho-kinaz proteinini kodlayan ROCK2 geninde Thr431Asn rs2230774 G/T polimorfizmi ve Rho proteininin aktivasyon düzenleyicisi olan GEF proteinlerini kodlayan ARHGEF10 geninde Arg338Thr rs4376531 C/G polimorfizmi hasta ve kontrol grubunda genotipik olarak karşılaştırılmak üzere seçildi.

EKSPRESYON ANALİZİ YAPILACAK MİRNA SEÇİMİ

AAM hastalarında yapılan miRNA çalışmaları sınırlı sayıda olduğundan, ADRB3, ARHGEF10, ROCK2 gen bölgelerini hedef alan miRNA'lar targetscan, mirtarbase, microrna.org ve mirDB veri tabanlarında tarandı ve yüksek skora sahip,

hedefleri belirtilen genler olabilecek, tüm sonuçlar içinden iki veya üç veri tabanında da bulunan, bu genlerle ilişkisi en yüksek düzeyde olabileceği kabul edilebilecek 12 miRNA seçildi. Çalışılacak miRNA'lar ADRB3 gen bölgesi için hsa-let-7b-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-4458 ve hsa-miR-4500; ROCK2 gen bölgesi için hsa-miR-124-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-142-3p ve hsa-miR-200c-3p; ARHGEF10 gen bölgesi için hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-302a, hsa-miR-302b ve hsa-miR-367-3p olarak belirlendi. Plazma miRNA ekspresyon seviyelerini normalize etmek için referans miRNA olarak hsa-miR-30e-5p kullanıldı.



GENOTİP ANALİZİ

Real-Time PCR Genotipleme analizi için TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Reaksiyon Fast Probe Master Mix (Biotium, ABD) 'in koşullarına göre Step One Plus Real-Time PCR cihazı (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak

gerçekleştirildi. Allele özgün tasarlanan hibridizasyon problemlerinin her bir reaksiyon döngüsündeki floresan ışınması ölçülerek farklı allelleri taşıyan oligonükleotidlerin amplifikasyon miktarları belirlendi. Reaksiyon koşulları, 10 µL 2X Fast Probe Master Mix, 0,5 µL prob, 1 µL DNA, 8,5 µL DNaz free water şeklinde gerçekleştirildi (Tablo 3). PCR şartları, 95°C’de 5 dakika 1 döngü, (95°C’de 15 saniye / 60°C’de 60 saniye) 40 döngü olacak şekilde reaksiyon kuruldu (Tablo 4).

Tablo 3. Genotipleme için PCR içeriği

2X Fast Probe Master Mix	10 µl
Problar	0,5 µl
DNA	1 µl
DNase-free water	8,5 µl
Toplam hacim	20 µl

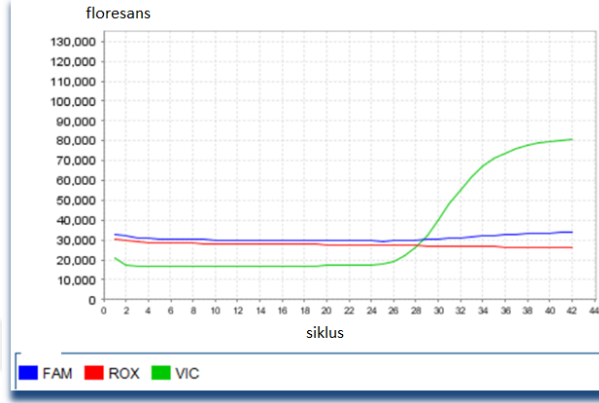
Tablo 4. Genotipleme için PCR reaksiyon koşulları

Enzim Aktivasyonu	5 dk	95 C ⁰	} 40 döngü
Denatürasyon	15 sn	95 C ⁰	
Bağlanma	60 sn	60 C ⁰	

GENOTİPİK DEĞERLENDİRME

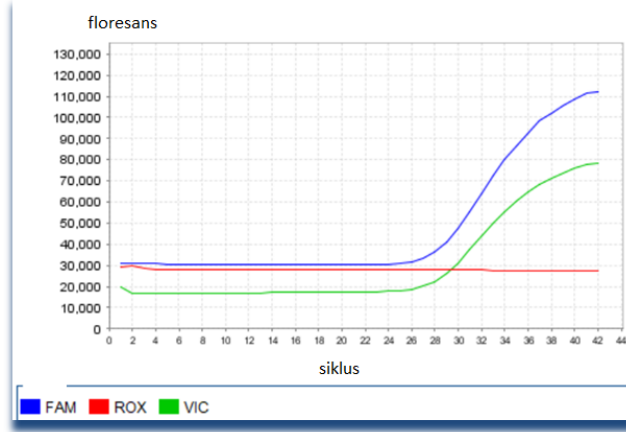
StepOne™ Software v2.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ABD) yazılımı ile logaritmik çizelgede Real-Time PCR cihazı ile elde edilen gerçek zamanlı amplifikasyon eğrilerinin analizi TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti prosedürüne göre yapılarak genotipler belirlendi. Buna göre polimorfik allelleri taşıyan ve 5’ ucunda prob bağlı DNA oligonükleotidinin floresan ışınma miktarının birim PCR termal döngüsüne göre

artış eğrisinin sigmoidal olması beklenir. Çünkü DNA çift zincirli moleküler yapıya sahip olduğundan her bir döngü sonunda DNA miktarı iki katına çıkar ve bunun sonucu olarak üssel bir fonksiyon grafiği elde edilmesi gerekir. Ancak reaksiyon sonunda ortamdaki PCR bileşenleri tükeneceğinden eğri plato evresine girer ve yatay seyreder.

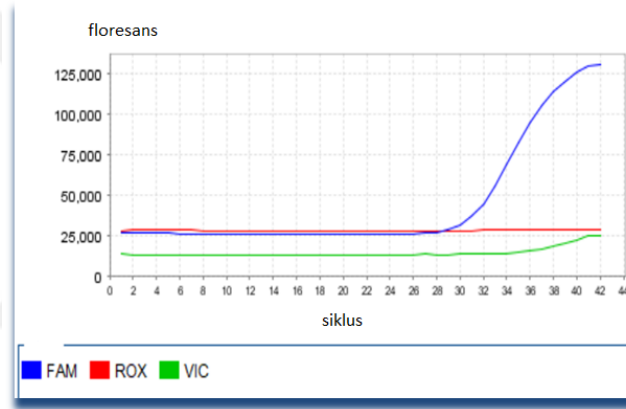


Şekil 10. Homozigot Atasal Genotip

Polimorfik olmayan allel yeşil renkli floresans oluşturan VIC florofor boyası ile yeşil renkteki sigmoidal eğriyi oluştururken, mavi renkli sigmoidal eğri ise polimorfik olan allelin FAM florofor boyası içeren primerleri ile amplifikasyonu sonucu oluşur. Yani polimorfik olmayan atasal allel yeşil VIC, polimorfik allel mavi FAM boyası ile işaretlenir. Kırmızı renkli yatay çizgi ise ROX pasif referans boyasını temsil eder. ROX, analiz sırasında floresan ışımının normalize edilebilmesi için gerekli referans ışımayı yapar. ROX ışımaya bağlı olarak da her deneysel plan kendine otomatik bir bazal seviye belirler. Allel ayrımında grafikte eşik değeri geçebilen ışımalar göz önünde bulunduruldu (Şekil 10, 11, 12).

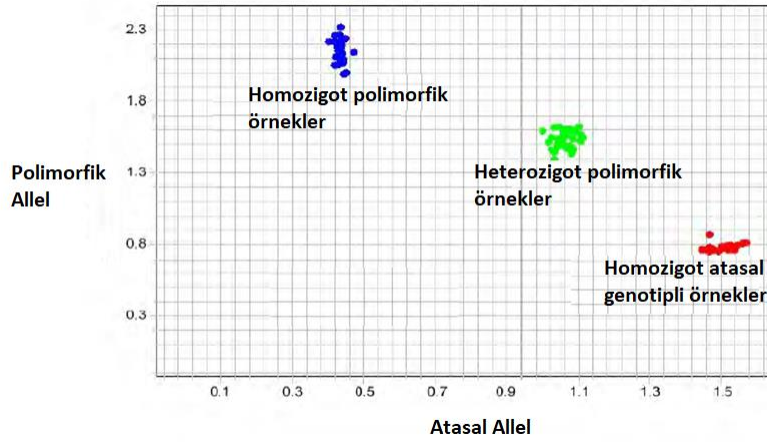


Şekil 11. Heterozigot Polimorfik Genotip



Şekil 12. Homozigot Polimorfik Genotip

Allelleri tanımlamada allelik diskriminasyon grafiği kullanıldı. Allelik diskriminasyon grafiğinde mavi işaretliler homozigot polimorfik genotipler, kırmızı renkli olanlar ise homozigot atasal genotipler olarak değerlendirildi. Yatay eksen atasal allelli ve düşey eksen polimorfik alleli temsil etmekteydi. Ortada bulunan yeşil renkli grup ise hem atasal hem polimorfik allel içeren heterozigot polimorfik genotipi temsil etmekteydi (Şekil 13).



Şekil 13. Allelik Diskriminasyon Grafiği

MİRNA EKSPRESYON ANALİZİ

miRNA'ların ekspresyon analizleri Step One Plus Real-Time PCR cihazında (Thermo Fisher Scientific, ABD) gerçekleştirildi. Syber Green (miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit, Qiagen, ABD Kat. No:339347) ile işaretlenmiş cDNA dizisine analiz edilecek miRNA primerleri bağlanması sonucunda cihaz tarafından syber green boyasının floresan ışımaya miktarı saptanması ile gerçekleştirildi. RNA primerleri olarak miRCURY LNA™ miRNA PCR Assays kullanıldı. Reaksiyon koşulları; 5 µL 2X miRCURY SYBR Green Master Mix, 0,5 µL ROX referans boyası, 1 µL primer mix, 3 µL cDNA (1/30 dilüsyonlu), 0,5 µL RNaz free water şeklinde gerçekleştirildi (Tablo 5). PCR şartları; 95°C'de 10 dakika 1 döngü, (95°C'de 10 saniye / 60°C'de 10 saniye) 40 döngü şeklinde kuruldu (Tablo 6) ve en son 55°C-90°C arası 0,1°C hassasiyette melting curve analizi yapıldı. Normalizasyon için hsa-miR-30e-5p kullanıldı.

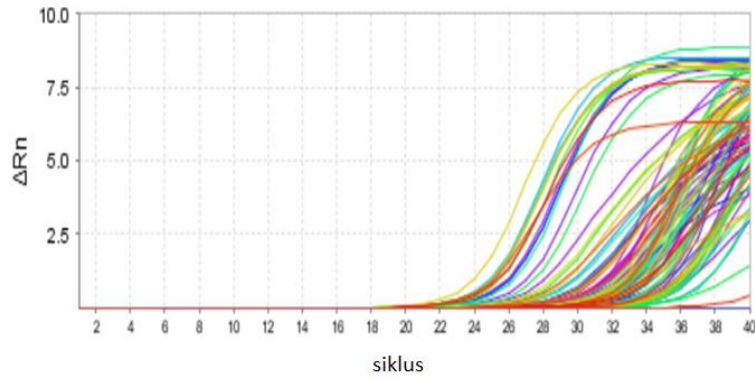
Tablo 5. MiRNA ekspresyon analizi için PCR içeriği

2X miRCURY SYBR Green Master Mix	5 µl
ROX referans boyası	0,5 µl
Primer mix	1 µl
cDNA	3 µL (1/30 dilüsyonlu)
RNase-free water	0,5 µl
Toplam hacim	10 µl

Tablo 6. MiRNA ekspresyon analizi için reaksiyon şartları

Enzim Aktivasyonu	10 dk	95 C ⁰	} 40 döngü
Denatürasyon	10 sn	95 C ⁰	
Bağlanma	60 sn	60 C ⁰	

StepOne™ Software v2.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ABD) yazılımı ile logaritmik çizelgede Real-Time PCR cihazı ile elde edilen gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri ile ekspresyon düzeyleri belirlendi (Şekil 14).



Şekil 14. Logaritmik RT-PCR ekspresyon eğrileri

Analizlerin sonunda ekspresyonu tespit edilebilen her miRNA için birer Ct (cycle threshold/eşik siklus=oluşan her logaritmik eğride, miRNA ekspresyon miktarının eşik değeri geçtiği ilk siklus sayısı) değeri elde edildi. Tüm örneklerde her gen için ayrı ayrı Δct ($\Delta ct =$ ilgili genin Ct değeri - normalizatör genin Ct değeri) değeri hesaplandı. $2^{-\Delta ct}$ formülü kullanılarak göreceli miRNA ekspresyon değerleri hesaplandı. Hasta ve kontrol grubuna ait sonuçlar ortanca $2^{-\Delta ct}$ değerleri oranlanarak kat değişimi şeklinde verildi (53).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS 24.0 (Chicago, ABD) paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, ortanca (minimum ve maksimum değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Çalışma grubundaki bir örneğin Hardy-Weinberg eşitliğindeki toplumdan rastgele alınan örneklerden biri olup olmadığını test etmek için Ki-kare uygunluk testi uygulandı. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (ikili incelemeler için Tukey testi) ve İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik testi kullanıldı. Parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi (ikili incelemeler için Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi) ve Mann Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar ise Ki kare analizi ile incelendi. Değişkenlerin tanısal performans incelemesi için ROC analizi yöntemi kullanıldı. ROC analizi ile değişkenler için uygun kestirim noktaları, duyarlılık ve özgüllük değerleri ve eğri altında kalan alanlar incelendi (53). Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

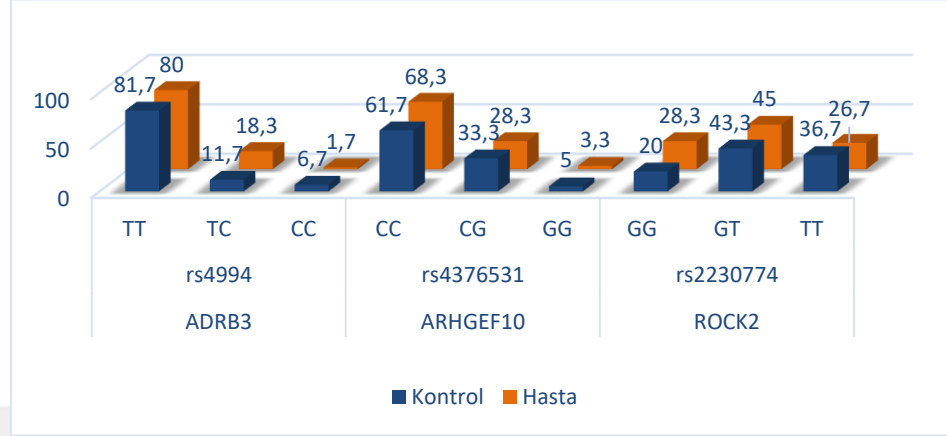
HASTA VE KONTROL GRUPLARINA AİT KİŞİSEL VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmaya katılan 60 hasta ve 60 kontrol birey arasında yaş, boy, kilo, BMI (Body Mass Index) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Hasta grubun yaş ortanca değeri 60, kontrol grubunun 58,5 idi. Boy ortanca değerleri hasta grupta 1,56 m, kontrol grubunda 1,6 m idi. Hasta grubun ortanca kilo değeri 72,8 kg iken kontrol grubunun ki 70 kg idi. BMI ortanca değerleri hasta grupta 30,3, kontrol grubunda 28,1 olarak hesaplandı (Tablo 7).

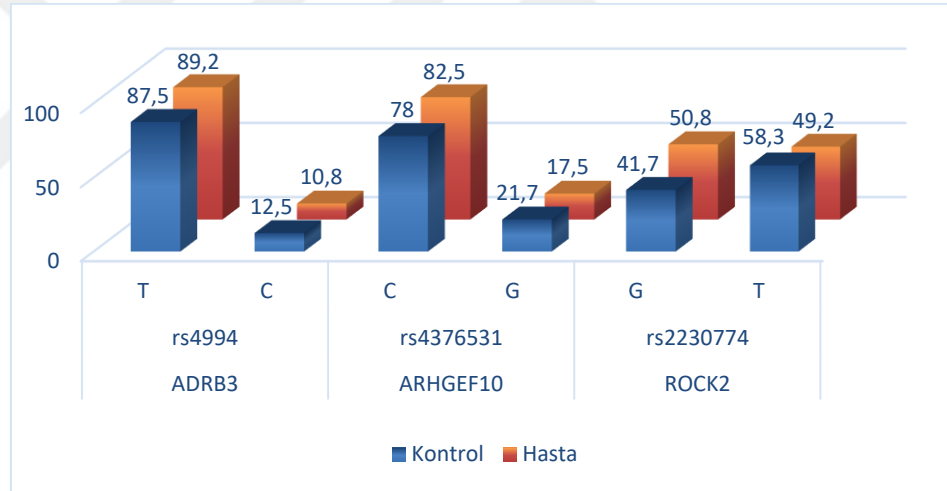
Tablo 7. Hasta ve kontrol gruplarında yaş, boy, kilo, bel çevresi ve BMI değerleri

Özellikler	Grup	Mean±SD	Ortanca	Min	Max	p değeri
Yaş	kontrol	55,8±11,8	58,5	27	76	0,483
	hasta	56,6±15,1	60	23	83	
Boy	kontrol	1,59±0,07	1,60	1,40	1,72	0,080
	hasta	1,57±0,64	1,56	1,39	1,70	
Kilo	kontrol	72±13	70	50	112	0,525
	hasta	73,9±16,4	72,8	40	125	
BMI	kontrol	28,6±5,05	28,1	19,2	43,8	0,101
	hasta	30±6,17	30,3	17,8	45,9	

GRUPLARIN POLİMORFİZMLERE AİT GENOTİP VE ALLEL DAĞILIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ



Şekil 15. Genotip dağılımı yüzde verileri grafiği



Şekil 16. Allel dağılımı yüzde verileri grafiği

Beklenen değerler ile gözlenen değerler arasında hasta ve kontrol grubunda Hardy-Weinberg eşitliğinden anlamlı sapma görülmedi ($p>0,05$).

1.ADRB3-rs4994 Polimorfizmine Ait Genotip ve Allel Dağılımının Değerlendirilmesi

ADRB3 geninde değişim gözlenmemiş homozigot bireyler TT, heterozigot polimorfik bireyler TC, homozigot polimorfik bireyler CC genotipine sahipti. 60 hasta ve 60 kontrolün değerlendirmeye alınması sonucu hasta ve kontrol grupları arasında

genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Hasta grubunda TT genotipi %80, TC genotipi %18,3 ve CC genotipi %1,7 oranında görülürken, kontrol grubunda TT genotipi %81,7, TC genotipi %11,7 ve CC genotipi %6,7 idi (Tablo 8). ADRB3 geni için hasta grubunda T alleli %89 ve C alleli %11 oranında görülürken, kontrol grubunda T alleli %87,5 ve C alleli %12,5 idi. Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 9).

2. ARHGEF10-rs4376531 Polimorfizmine Ait Genotip ve Allel Dağılımının Değerlendirilmesi

ARHGEF10 geninde değişim gözlenmemiş homozigot bireyler CC, heterozigot polimorfik bireyler CG, homozigot polimorfik bireyler GG genotipine sahipti. ARHGEF10 geni için 60 hasta ve 60 kontrol örneği değerlendirildi. Hasta grubunda CC genotipi %68,3, CG genotipi %28,3 ve GG genotipi %3,3 oranında, kontrol grubunda CC genotipi %61,7, CG genotipi %33,3 ve GG genotipi %5 oranında bulundu (Tablo 8). Hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Hasta grubunda C alleli %82,5 ve G alleli %17,5 oranında görülürken, kontrol grubunda C alleli %78 ve G alleli %21,7 idi. Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 9).

3. ROCK2-rs2230774 Polimorfizmine Ait Genotip ve Allel Dağılımının Değerlendirilmesi

ROCK2 geninde değişim gözlenmemiş homozigot bireyler GG, heterozigot polimorfik bireyler GT, homozigot polimorfik bireyler TT genotipine sahipti. ROCK2 geni için 60 hasta ve 60 kontrol verisi arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Hasta grubunda GG genotipi %28,3, GT genotipi %45 ve TT genotipi %26,7 iken, kontrol grubunda GG genotipi %20, GT genotipi %43,3 ve TT genotipi %36,7 idi (Tablo 8). ROCK2 geni için hasta grubunda G alleli %50,8 ve T alleli %49,2 iken, kontrol grubunda G alleli %41,7 ve T alleli %58,3 idi. Kontrol ve hasta grupları arasında allelik dağılım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 9).

Tablo 8. ADRB3, ARHGEF10, ROCK2 genleri için genotip dağılımları

Gen Adı	Majör/Minör Allel	Genotip	Kontrol N(%)	Hasta N(%)	X ²	p değeri
<i>ADRB3</i> <i>rs4994</i>	T/C	TT	49(81,7)	48(80)	2,834	0,242
		TC	7(11,7)	11(18,3)		
		CC	4(6,7)	1(1,7)		
			N=60	N=60		
<i>ARHGEF10</i> <i>rs4376531</i>	C/G	CC	37(61,7)	41(68,3)	0,65	0,722
		CG	20(33,3)	17(28,3)		
		GG	3(5)	2(3,3)		
			N=60	N=60		
<i>ROCK2</i> <i>rs2230774</i>	G/T	GG	12(20)	17(28,3)	1,828	0,401
		GT	26(43,3)	27(45)		
		TT	22(36,7)	16(26,7)		
			N=60	N=60		

Tablo 9. ADRB3, ARHGEF10, ROCK2 genleri için allel dağılımları

Gen Adı	Kontrol Majör/Minör Allel N (%)	Hasta Majör/Minör Allel N (%)	p değeri
<i>ADRB3</i>	T/C 105/15 87,5/12,5	T/C 107/13 89,2/10,8	0,69
<i>ARHGEF10</i>	C/G 94/26 78/21,7	C/G 99/21 82,5/17,5	0,42
<i>ROCK2</i>	G/T 50/70 41,7/58,3	G/T 61/59 50,8/49,2	0,16

HASTALARDA GENOTİPİK DAĞILIMA GÖRE AAM SEMPTOM SKORU DEĞERLENDİRMESİ

ADRB3 geni için AAM semptom skoru değerlendirildiğinde, TT genotipinde olanların AAM semptom skoru ortalaması $29,1\pm 9,28$ bulunurken, benzer şekilde TC genotipinde olanların ortalaması $28,5\pm 8,9$ idi. Bu gen için farklı genotipler arasında AAM semptom skoru açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı. Bu gen için CC genotipine sahip hasta sayısı 1 olduğu için istatistiksel değerlendirmeye alınmadı ve toplam sayı 59 üzerinden hesaplandı (Tablo 10).

ARHGEF10 geni için CC genotipine sahip hastaların AAM semptom skoru ortalaması $28,7\pm 8,88$ ve CG genotipinde olan hastalarınki ise $33,3\pm 4,94$ idi. AAM semptom skoru açısından CG genotipindeki hastaların ortalama değerleri yüksek olmasına rağmen CC ve CG genotipine sahip olmak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadı. Bu gen için GG genotipine sahip hasta sayısı 2 olduğu için istatistiksel değerlendirmeye alınmadı ve toplam sayı 58 üzerinden hesaplandı (Tablo 10).

ROCK2 geni için 60 hasta değerlendirilmeye alındı ve genotipler arasında AAM semptom skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p=0,044$). GG genotipine sahip hastaların AAM semptom skor ortalaması $29,5\pm 8,25$ bulunurken, GT genotipi için bu sayı $31,3\pm 9,01$ idi. TT genotipi için ise AAM semptom skor ortalaması $24,3\pm 8,76$ idi. Bu veriler doğrultusunda AAM skoru açısından GG-TT ve GG-GT (homozigot atasal ile homozigot polimorfik ve homozigot atasal ile heterozigot polimorfik) genotipleri arasında anlamlı fark bulunmazken, GT-TT (heterozigot ve homozigot polimorfik hastalar) genotipine sahip olanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,039$). Heterozigot polimorfik genotipe sahip olanların AAM skoru homozigot polimorfik genotipinde olanlardan anlamlı olarak yüksekti (Tablo 10).

Tablo 10. Hastaların genotiplerine göre AAM semptom skorları

Gen Adı	Genotip	AAM Semptom Skoru ort±SD	p değeri
<i>ADRB3</i>	TT	29,1±9,28	0,717
	TC	28,5±8,9 N=59	
<i>ARHGEF10</i>	CC	28,7±8,88	0,916
	CG	28,9±10 N=58	
<i>ROCK2</i>	GG	29,5±8,25	0,044
	GT	31,3±9,01	
	TT	24,3±8,76 N=60	

MİRNA'LARIN EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Hasta ve kontrol plazmalarında hsa-let-7b-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-142-3p ve hsa-miR-200c-3p miRNA'larına ait ekspresyon düzeyleri tespit edilirken; hsa-miR-124-3p, hsa-miR-302a, hsa-miR-302b, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-4458 ve hsa-miR-4500 miRNA'larına ait ekspresyon düzeyleri analiz sırasındaki teknik sebeplerden dolayı tespit edilemedi. Tespit edilemeyen miRNA'lar için örnek PCR plate görüntüsü şekil 17'de verilmiştir.



Şekil 17. AAM hastalarında plazmada tespit edilemeyen miRNA'lar için örnek PCR plate görüntüsü

Analiz sırasındaki teknik sebeplerden dolayı hsa-let-7b-5p için 4 hasta, 1 kontrol, hsa-miR-92a-3p için 10 hasta, 8 kontrol, hsa-miR-98-5p için 7 hasta, 7 kontrol, hsa-miR-139-5p için 7 hasta, 2 kontrol, hsa-miR-142-3p için 4 hasta, 1 kontrol ve hsa-miR-200c-3p için 16 hasta, 9 kontrol örneğinin plazmalarında ekspresyon tespit edilemediğinden değerlendirmeye alınmadı.

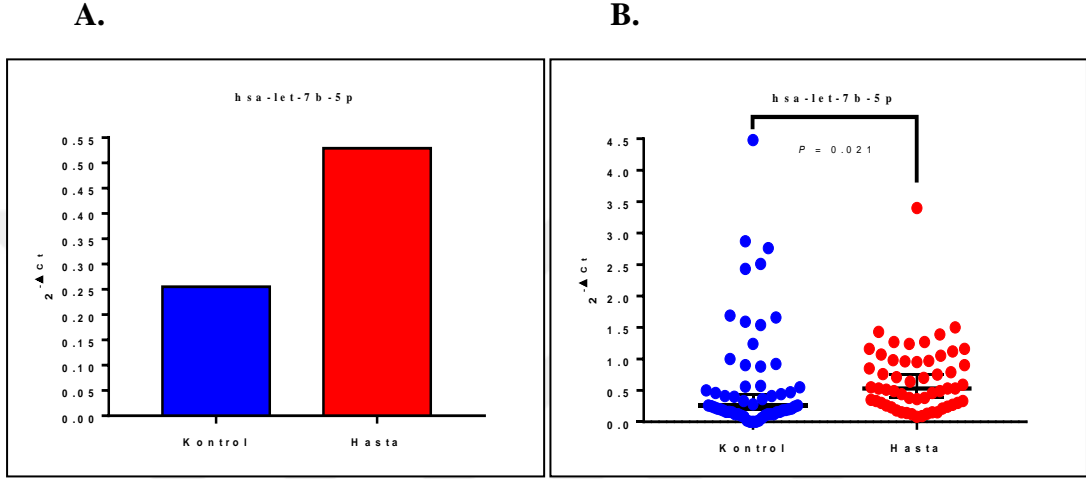
Hastalardaki göreceli miRNA ekspresyonları ile AAM skorları arasında anlamlı bir korelasyon saptanmazken analizi yapılan tüm miRNA'ların göreceli ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdi (Tablo 11).

Tablo 11. AAM'li hastalar ve kontrol grubunda miRNA ekspresyon düzeyleri ($2^{-\Delta Ct}$)

Değişkenler	Grup/N	Ort±SD	Ortanca	Min	Maks	P değeri
hsa-let-7b-5p	Kontrol/59	0,7130±1,07733	0,2551	0,00001	5,51	0,021
	Hasta/56	0,6658±0,54605	0,5285	0,08	3,4	
hsa-miR-92a-3p	Kontrol/52	50,1271±27,44103	47,1900	5,66	106,52	0,046
	Hasta/50	62,1334±31,98943	49,9400	27,13	154,88	
hsa-miR-98-5p	Kontrol/53	0,1602±0,23988	0,0758	0,01	1,08	0,0001
	Hasta/53	0,3214±28,330	0,2224	0,06	1,35	
hsa-miR-139-5p	Kontrol/58	0,3418±0,34718	0,2222	0,05	1,92	0,039
	Hasta/53	0,2600±0,28018	0,1517	0,02	1,23	
hsa-miR-142-3p	Kontrol/59	3,6599±3,68592	2,3817	0,06	18,78	0,011
	Hasta/56	5,9820±6,13991	3,5433	0,54	32,54	
hsa-miR-200c-3p	Kontrol/51	0,1132±0,18419	0,0565	0,01	1,04	0,004
	Hasta/44	0,2621±0,30472	0,1147	0,01	1,03	

1. Hsa-let-7b-5p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

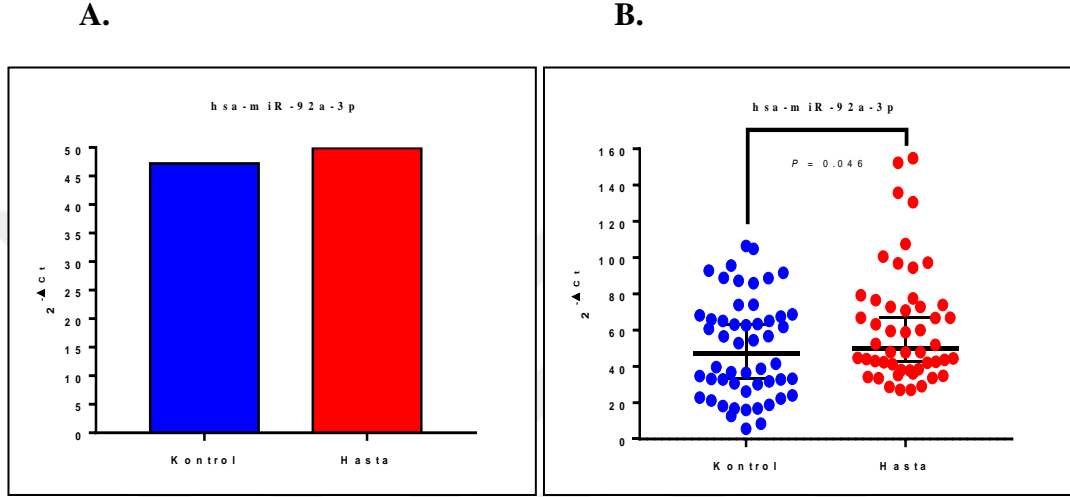
Kontrol grubunda 59, hasta grubunda 56 birey değerlendirmeye alındı. Kontrol grubunda göreceli ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta Ct} = 0,2551$, hasta grubunda $2^{-\Delta Ct} = 0,5285$ idi. Ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubu değerleri kontrol grubuna göre 2,07 kat artmıştı (Şekil 18A). Hsa-let-7b-5p ekspresyon düzeyleri hastalarda anlamlı olarak yüksekti ($p=0,021$) (Şekil 18B).



Şekil 18. AAM'li hastalarda ve kontrol grubunda hsa-let-7b'ye ait göreceli ekspresyon değerleri A) Ortanca Değerleri B) Ekspresyon dağılımları

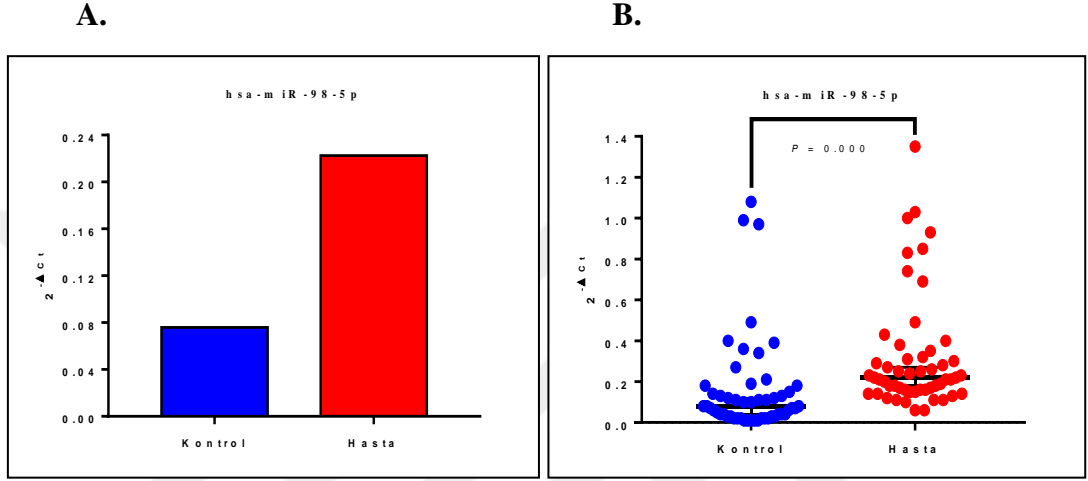
2. Hsa-miR-92a-3p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda 52, hasta grubunda 50 birey değerlendirmeye alındı. Kontrol grubunda göreceli ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta Ct} = 47,1900$, hasta grubunda $2^{-\Delta Ct} = 49,9400$ idi. Ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubu değerleri kontrol grubuna göre 1,05 kat artmıştı (Şekil 19A). Hsa-miR-92a-3p ekspresyon düzeyleri hastalarda anlamlı olarak yüksekti ($p=0,046$) (Şekil 19B).



3. Hsa-miR-98-5p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

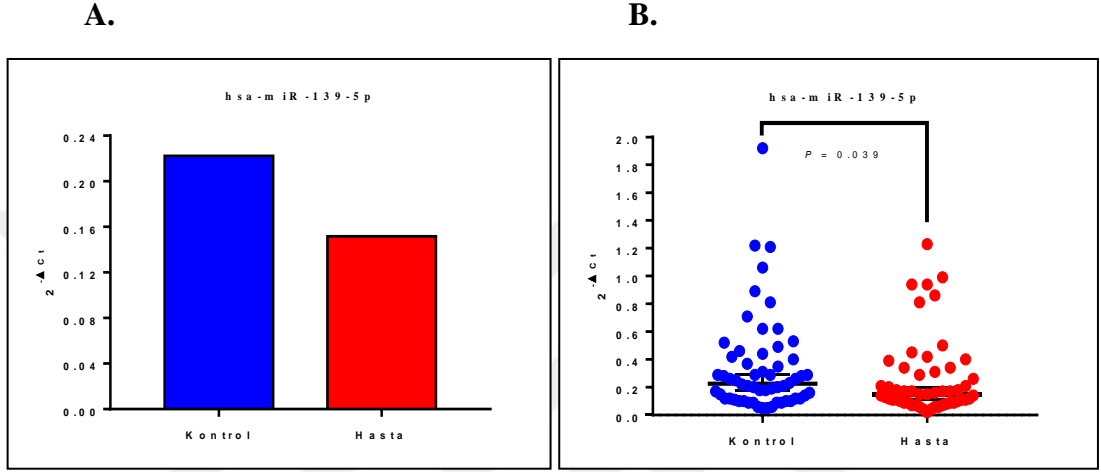
Kontrol grubunda 53, hasta grubunda ise 53 birey değerlendirmeye alındı. Kontrol grubunda göreceli ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta Ct} = 0,0758$, hasta grubunda $2^{-\Delta Ct} = 0,2224$ idi. Ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubu değerleri kontrol grubuna göre 2,93 kat artmıştı (Şekil 20A). Hsa-miR-98-5p ekspresyon düzeyleri hastalarda anlamlı olarak yüksekti ($p=0,0001$) (Şekil 20B).



Şekil 20. AAM’li hastalarda ve kontrol grubunda hsa-miR-98-5p’ye ait göreceli ekspresyon değerleri A) Ortanca Değerleri B) Ekspresyon dağılımları

4. Hsa-miR-139-5p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

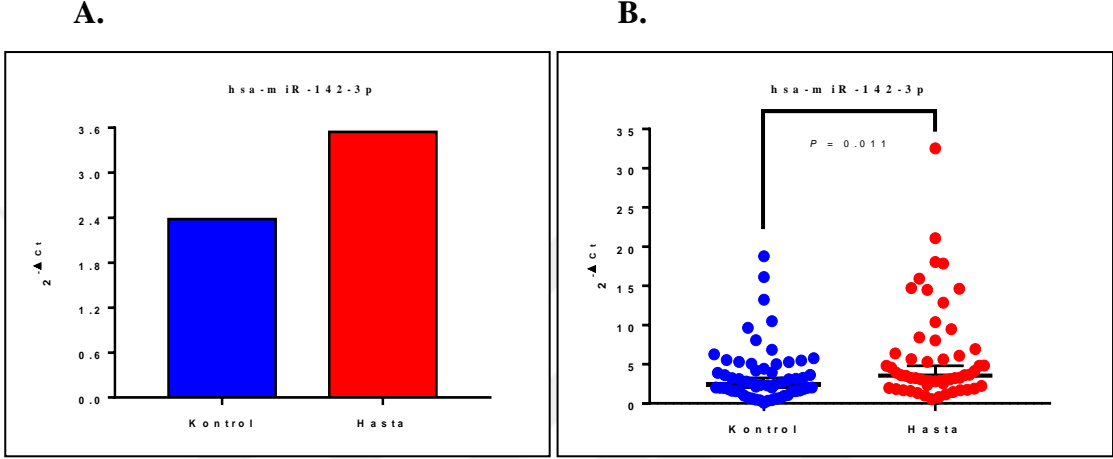
Kontrol grubunda 58, hasta grubunda ise 53 birey değerlendirildi. Kontrol grubunda göreceli ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta Ct} = 0,2222$, hasta grubunda $2^{-\Delta Ct} = 0,1517$ idi. Ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubu değerlerin kontrol grubuna göre 1,46 kat azalmıştı (Şekil 21A). Hsa-miR-139-5p genine ait ekspresyon düzeyleri hastalarda anlamlı olarak düşüktü ($p=0,039$) (Şekil 21B).



Şekil 21. AAM'li hastalarda ve kontrol grubunda hsa-miR-139-5p'ye ait göreceli ekspresyon değerleri A) Ortanca Değerleri B) Ekspresyon dağılımları

5. Hsa-miR-142-3p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

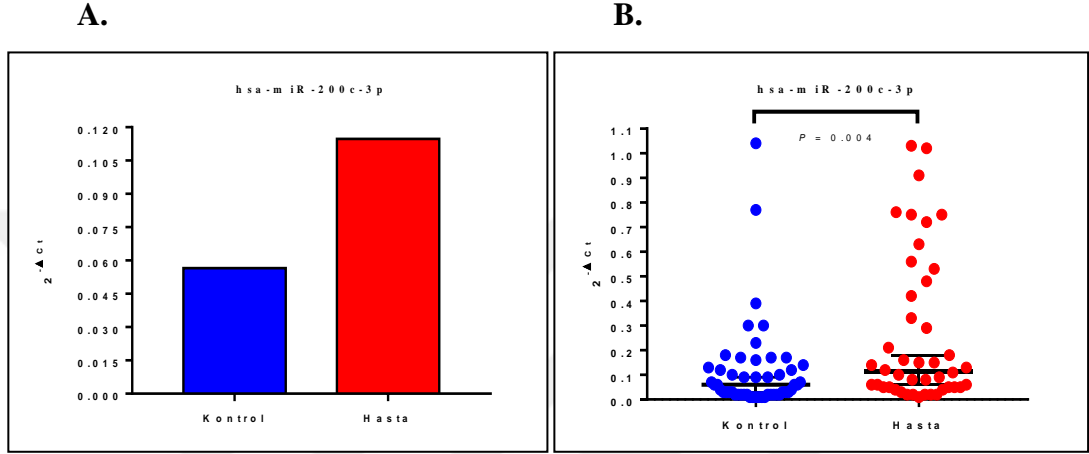
Kontrol grubunda 59, hasta grubunda ise 56 birey değerlendirmeye alındı. Kontrol grubunda göreceli ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta Ct} = 2,3817$, hasta grubunda $2^{-\Delta Ct} = 3,5433$ idi. Ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubu değerleri kontrol grubuna göre 1,49 kat artmıştı (Şekil 22A). Hsa-miR-142-3p ekspresyon düzeyleri hastalarda anlamlı olarak yüksekti ($p=0,011$) (Şekil 22B).



Şekil 22. AAM’li hastalarda ve kontrol grubunda hsa-miR-142-3p’ye ait göreceli ekspresyon değerleri A) Ortanca Değerleri B) Ekspresyon dağılımları

6. Hsa-miR-200c-3p Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda 51, hasta grubunda ise 44 birey değerlendirildi. Kontrol grubunda göreceli ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta Ct} = 0,0565$, hasta grubunda $2^{-\Delta Ct} = 0,1147$ idi. Ekspresyon düzeyleri bakımından hasta grubu değerleri kontrol grubuna göre 2,03 kat artmıştı (Şekil 23A). Hsa-miR-200c-3p genine ait ekspresyon düzeyleri hastalarda anlamlı olarak yüksekti ($p=0,004$) (Şekil 23B).



Şekil 23. AAM’li hastalarda ve kontrol grubunda hsa-miR-200c-3p’ye ait göreceli ekspresyon değerleri A) Ortanca Değerleri B) Ekspresyon dağılımları

MİRNA’LARIN ROC DEĞERLENDİRMESİ

Ekspresyonları değerlendirilen her bir miRNA için yapılan ROC analizi, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-142-3p ve hsa-miR-200c-3p’de anlamlı bulundu (Tablo 12). Bu miRNA’lardan beklediğimiz yönde düzey değişikliği bulunan 3 tanesinin tanısal performansları ikili ve üçlü kombinasyonlar şeklinde değerlendirildi. Hsa-let-7b-5p+hsa-miR-98-5p, hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p, hsa-let-7b-5p+hsa-miR-139-5p ve hsa-let-7b-5p+hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonlarının ROC eğrilerine göre tanısal performansları karşılaştırıldı. Hsa-let-7b-5p+hsa-miR-98-5p, hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p ve hsa-let-7b-5p+hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonlarının ROC analizleri anlamlı idi (Tablo 14).

Tablo 12. MiRNA'ların ROC eğrilerine göre AUC ve p değerleri

miRNA'lar	AUC (%95 GA)	P Değeri
hsa-let-7b-5p	0,625 (0,520-0,729)	0,021
hsa-miR-92a-3p	0,615 (0,504-0,725)	0,046
hsa-miR-98-5p	0,799 (0,710-0,889)	0,0001
hsa-miR-139-5p	0,614 (0,508-0,719)	0,039
hsa-miR-142-3p	0,637 (0,536-0,738)	0,011
hsa-miR-200c-3p	0,625 (0,520-0,729)	0,004

Hsa-let-7b-5p için AUC (Area Under Curve: ROC eğrisinin altında kalan alan)=0,625 (%95 Güven Aralığı (GA): 0,520 – 0,729; p=0,021) ve kestirim değeri olan 0,2568'de, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 78,6 ve % 50,8 idi (Şekil 24 A).

Hsa-miR-92a-3p için AUC=0,615 (%95 GA: 0,504 – 0,725; p=0,046) ve kestirim değeri olan 33,37'de, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 92 ve % 38,5 idi (Şekil 24 B).

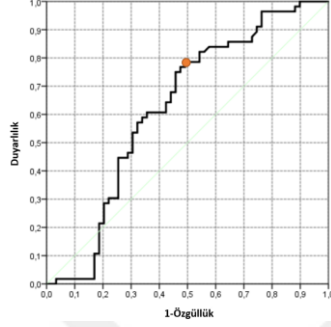
Hsa-miR-98-5p için AUC=**0,799** (%95 GA: 0,710 – 0,889; p=0,0001) ve kestirim değeri olan 0,1091'de, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 94,3 ve % 62,3 idi (Şekil 24 C).

Hsa-miR-139-5p için AUC=0,614 (%95 GA: 0,508 – 0,719; p=0,039) ve kestirim değeri olan 0,1772'de, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 62,3 ve % 63,9 idi (Şekil 24 D).

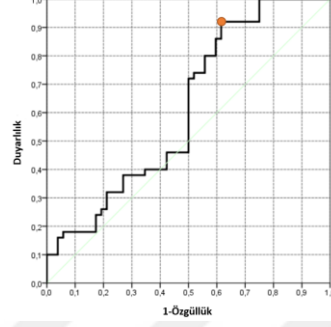
Hsa-miR-142-3p için AUC=0,637 (%95 GA: 0,536 – 0,738; p=0,011) ve kestirim değeri olan 2,7983'te, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 71,4 ve % 55,9 idi (Şekil 24 E).

Hsa-miR-200c-3p için $AUC=0,625$ (%95 GA: 0,520 – 0,729; $p=0,004$) ve kestirim değeri olan 0,0326'da, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 86,4 ve % 45,1 idi (Şekil 24 F).

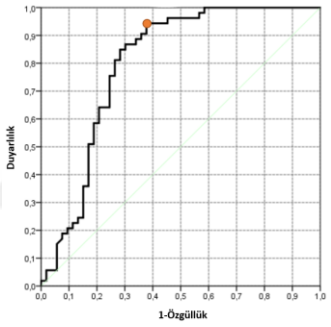
A. hsa-let-7b-5p



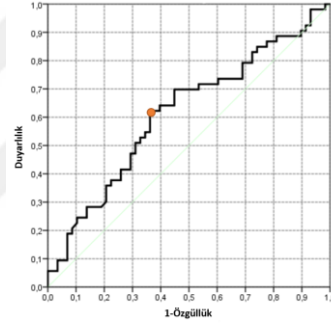
B. hsa-miR-92a-3p



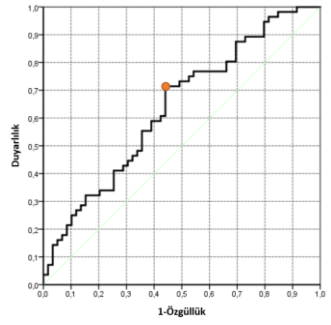
C. hsa-miR-98-5p



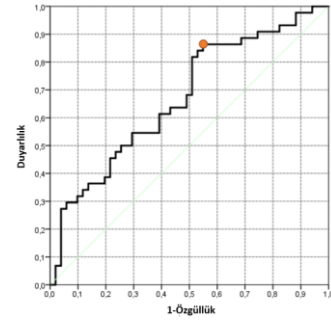
D. hsa-miR-139-5p



E. hsa-miR-142-3p



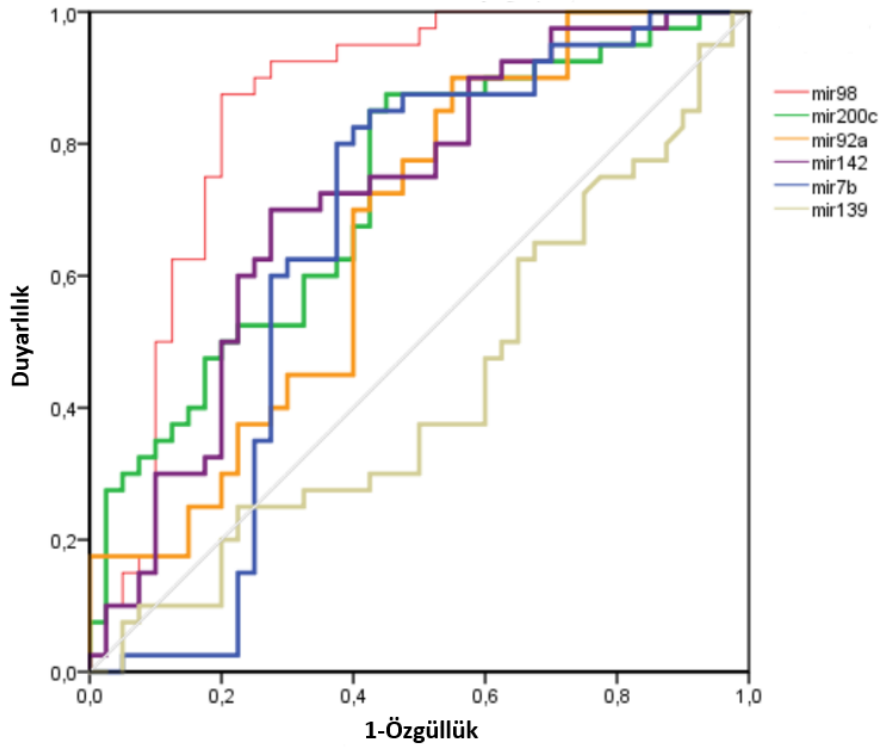
F. hsa-miR-200c-3p



Şekil 24. MiRNA'ların ROC Eğrileri ve İşaretlenmiş Kestirim Değerleri

Tablo 13. MiRNA'ların ROC eğrilerine göre duyarlılık (%), özgüllük (%) ve kestirim değerleri

miRNA'lar	Duyarlılık	Özgüllük	Kestirim Değeri
hsa-let-7b-5p	78,6	50,8	0,2568
hsa-miR-92a-3p	92	38,5	33,37
hsa-miR-98-5p	94,3	62,3	0,1091
hsa-miR-139-5p	62,3	63,9	0,1772
hsa-miR-142-3p	71,4	55,9	2,7983
hsa-miR-200c-3p	86,4	45,1	0,0326



Şekil 25. MiR98, miR200c, miR92a, miR142, miR7b, miR139 için ROC Eğrileri

Tablo 14. MiRNA kombinasyonlarının ROC eğrilerine göre AUC, p, duyarlılık (%) ve özgüllük (%) değerleri

Kombinasyonlar	AUC (%95 GA)	P Değeri	Duyarlılık	Özgüllük
hsa-let-7b-5p hsa-mir-98-5p	0,801 (0,711- 0,891)	0,0001	92,5	66
hsa-mir-98-5p hsa-mir-139-5p	0,839 (0,750- 0,929)	0,0001	84	86,5
hsa-let-7b-5p hsa-mir-139-5p	0,578 (0,471- 0,686)	0,157	67,9	65,2
hsa-let-7b-5p hsa-mir-98-5p hsa-mir-139-5p	0,836 (0,746- 0,926)	0,0001	84	85,6

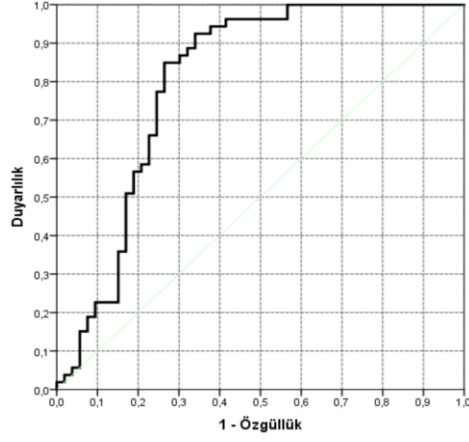
Hsa-let-7b-5p+hsa-miR-98-5p kombinasyonu için **AUC=0,801** (%95 GA: 0,711 – 0,891; p=0,0001; Duyarlılık= %92,5, Özgüllük= %66) idi (Tablo 14, Şekil 26 A).

Hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonu için **AUC=0,839** (%95 GA: 0,750 – 0,929; p=0,0001; Duyarlılık= %92,5, Özgüllük= %66) idi (Tablo 14, Şekil 26 B).

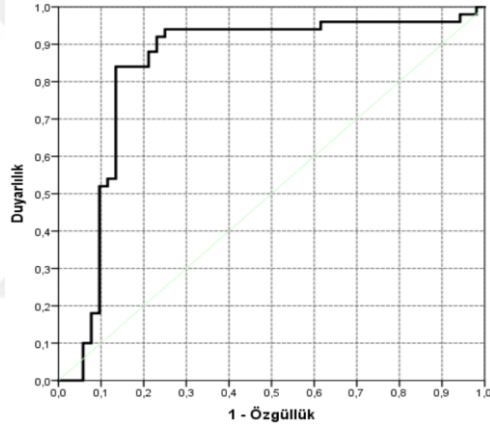
Hsa-let-7b-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonu için ROC eğrisi analizi anlamsızdı (AUC=0,578) (Tablo 14).

Hsa-let-7b-5p+hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonu için **AUC=0,836** (%95 GA: 0,746 – 0,926; p=0,0001; Duyarlılık= % 84, Özgüllük= % 85,6) idi (Tablo 14, Şekil 26 C).

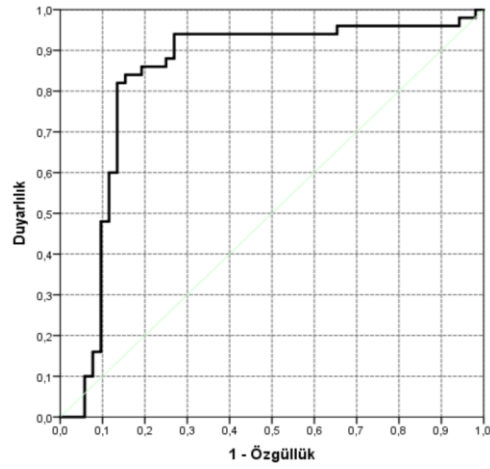
A. hsa-let-7b-5p+hsa-miR-98-5p kombinasyonu



B. hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonu



C. hsa-let-7b-5p+hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonu



Şekil 26. MiRNA kombinasyonlarının ROC Eğrileri

TARTIŞMA

AAM'li hastalarda, gevşemeden sorumlu ADRB3 reseptör genini hedef alan miRNA'ların düzeylerinde artış beklenir. Çalışmamızda AAM hastalarında bu geni hedef alan hsa-let-7b-5p ve hsa-miR-98-5p göreceli ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik bulundu. Hastaların AAM skorları ile hsa-let-7b-5p ve hsa-miR-98-5p göreceli ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı.

AAM'li hastalarda bu miRNA'ların düzeylerini araştıran çalışma olmamakla birlikte hsa-let-7b-5p ile ilgili Goto ve ark. yaptıkları derlemede prostat kanserli hastalarda, Knyazev ve ark. prostat kanserli hastaların plazmalarında benign prostat hiperplazisi olan hasta plazmalarına oranla, Kara ve ark. fibroadenomlu ve meme ca'lı hastaların doku örneklerinde, Vishnubalaji ve ark. kolorektal kanserli hastaların doku örneklerinde, Zhang ve ark. abdominal aort anevrizması olan hastaların plazması ile yaptıkları çalışmalarda hsa-let-7b-5p ekspresyonunun sağlıklı kişilere oranla azaldığını bildirmişlerdir (54-58). Slattery ve ark. kolorektal kanserli hastaların doku örneklerinde hsa-let-7b-5p ekspresyonunu sağkalım ve hastalık evresi ile ilişkilendirmişlerdir (59).

Hsa-miR-98-5p ile yapılmış çalışmalarda miR-98 ailesinin kanserli hastalarda genel olarak ekspresyonunun azalması üzerinde durulmuştur. Wang ve ark. miR-98 ailesinin Dicer 1 enzimini kodlayan mRNA'nın 3'UTR bölgesini hedef alarak onun ekspresyonunu baskıladığı dolayısı ile miRNA sentezinde inhibitör etkili olduğunu ortaya koymuşlardır (60). Zhau ve ark. küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastaların dokularında hsa-miR-98-5p ekspresyon azalması ile progresyon arasında ilişki ortaya koymuşlar, Fu ve ark. pankreas kanserli hastaların doku örneklerinde hsa-miR-98-5p'nin ekspresyonunun azalmasının tümör gelişimini tetiklediği ve tedavi hedefi olarak kullanılabileceğini savunmuşlardır (61, 62). Buna karşın Matin ve ark. prostat kanserli hastalarda hsa-miR-98-5p ekspresyonunun arttığını ve prostat kanserinin erken tanısında kullanılacak yeni bir biyobelirteç olabileceğini ileri sürmüşlerdir (63).

Bulgular değerlendirildiğinde ADRB3 reseptör genini hedef alan miRNA düzeylerindeki yükseklik, hedef gen inhibisyonu sonucu AAM semptomlarını ortaya

çıkabilir. AAM hastalarındaki ADRB3 reseptör aktivasyonundaki azalma mekanizmasını hsa-let-7b-5p ve hsa-miR-98-5p düzeylerindeki anlamlı yükseklikle ilişkilendirebiliriz. AAM patogeneğinde etkili olduğu düşünölen β 3 adrenerjik reseptörlerin fonksiyonunu moleküler düzeyde etki göstererek düzenleyen miRNA'ların düzeylerindeki değışiklikler, klinik durumu değerdendirme ve moleküler hedefe yönelik tedavi geliştirilmesi açısından yararlı olabilecektir.

AAM hastalarında ARHGEF10 genini hedef alan miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde azalma beklenirken, çalışmamızda bu geni hedef alan hsa-miR-92a-3p ekspresyon düzeylerinde hasta grubu değerdelerinin kontrol grubuna göre 1,05 kat artmış olduğu bulundu. Hastaların AAM skorları ile hsa-miR-92a-3p ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı.

Hsa-miR-92a-3p ile AAM ilişkisini araştıran çalışma bulunmamakla birlikte, yapılmış çalışmalara bakıldığında Marques ve ark. kalp yetmezliği hastalarında hsa-miR-92a-3p ekspresyonunda sağlıklı kontrollere oranla 3 kat azalma bulmuşlar ve kalp yetmezliği tanısında etkili bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini savunmuşlardır (AUC: 0,833) (64). Zang ve ark. abdominal aort anevrizmalı hastaların plazmalarında kontrollere göre hsa-miR-92a-3p ekspresyonunda azalma saptarken, Kim ve ark. sistemik lupus eritemetozuslu hastaların plazmalarında hsa-miR-92a-3p ekspresyonunda artma saptamışlardır (58, 65). Rong ve ark. Kawasaki hastalarının serumlarındaki hsa-miR-92a-3p ekspresyonundaki artışı koroner arter lezyonları ile yüksek ilişkili olduğunu bildirmişler ve Kawasaki hastalığında hsa-miR-92a-3p ekspresyon düzeyinin tanısai bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (AUC: 0,858) (66). Çalışmamızda AAM hastalarında hsa-miR-92a-3p ekspresyon düzeylerinin artmış olması, gen ve miRNA etkileşiminde moleküler düzeyde ek bir inhibitör mekanizma ya da miRNA'nın etkisini engelleyerek telafi eden başka bir mekanizmanın varlığı ile açıklanabilir. MiRNA ve ARHGEF10 arasındaki moleküler sinyal yolaklarının aydınlatılması için farklı örneklemlerde daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

AAM hastalarında kolinerjik yolak üzerinde durulduğunda ROCK2 geninin ekspresyonunu düzenleyen miRNA'ların seviyelerinde azalma beklenir. Bu hipoteze uygun olarak çalışmamızda ekspresyonunu değerdendirdiğimiz hsa-miR-139-5p'in

ekspresyon düzeylerinin hastalarda kontrol grubuna göre 1,46 kat azalmış olduğu bulundu. Hsa-miR-139-5p genine ait göreceli ekspresyon düzeyleri hastalarda sağlıklılara oranla anlamlı olarak düşüktü. Buna karşın hsa-miR-142-3p ekspresyon düzeyleri hastalarda kontrollere oranla 1,49 kat artmıştı. Hastalarda kontrollere göre hsa-miR-142-3p ekspresyon düzeyleri anlamlı olarak yüksekti. Hsa-miR-200c-3p'nin ekspresyon düzeyleri hastalarda kontrol grubuna oranla 2,03 kat artmıştı. Hsa-miR-200c-3p göreceli ekspresyon düzeyleri hastalarda sağlıklılara oranla anlamlı olarak yüksekti. Hastaların AAM skorları ile hsa-miR-139-5p, hsa-miR-142-3p ve hsa-miR-200c-3p ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı.

Hsa-miR-139-5p ekspresyon düzeyini değerlendiren çalışmalarda Zhang ve ark. abdominal aort anevrizması olan hastaların plazmalarında 5,5 kat azalma saptamışlar, Ratert ve ark. ile Yonemori ve ark. da yaptıkları iki ayrı çalışmada da mesane kanserli hastalarda hsa-miR-139-5p ekspresyon düzeylerinde sağlıklı kontrollere göre anlamlı azalma bulmuşlar ve bu miRNA'nın migrasyon ve invazyon üzerindeki etkisi ile metaztaz açısından kanser seyrinde iyi bir prognostik biyobelirteç olabileceğini savunmuşlardır (58, 67, 68). Wong ve ark. bizim çalışmamızdaki hedef gen üzerinden yaptıkları araştırmada hsa-miR-139-5p'in, birçok kanser türünde tümör baskılayıcı rolünün olduğunu, hepatoselüler kanserli dokularda ROCK2 inhibisyonu ile kanser hücrelerinin metaztaz potansiyellerini artırdığını göstermişlerdir (69).

Hsa-miR-142-3p ekspresyonu için çalışmalarda çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Urquidi ve ark. 61 mesane kanserli hastanın idrar örneklerinde sağlıklılara oranla 3 kat artmış ekspresyon düzeyi saptarken, Menguel ve ark. 181 hastanın idrar örneğinde sağlıklılara oranla 4 kat azalmış ekspresyon düzeyleri bildirmişlerdir (70, 71). Toro ve ark. artmış hsa-miR-142-3p ekspresyon düzeyleri ile ailesel dilate kardiyomiyopati patofizyolojisinin ilişkili olduğunu ve tanıda destekleyici bir biyobelirteç olabileceğini öne sürmüşlerdir (AUC: 0,764) (72). Çalışmamızda hsa-miR-142-3p göreceli ekspresyon düzeylerinin beklenin aksine hasta grupta artmış olması, hastalarda AAM tablosuna sebep olabilecek polimorfizm ya da ROCK2 genini hedef alan miRNA'ların değişimi dışında farklı moleküler mekanizmaların da olabileceğinin düşündürür. Bu miRNA farklı moleküler düzenleme mekanizmaları ile fonksiyon görüyor olabilir.

Bibi ve ark. ile He ve ark. derlemelerinde hsa-miR-200c-3p'nin proliferasyon ve invazyon üzerindeki inhibitör etkisi ile birçok kanser türünde hasta dokularda ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir (73, 74). Liu ve ark. ile Zhou ve ark. yaptıkları iki ayrı çalışmada da mesane kanserli hastalarda hsa-miR-200c-3p ekspresyon düzeyi kontrollere oranla azalmış olarak bulunmuştur (75, 76). Zhang ve ark. abdominal aort anevrizması olan hastaların plazma değerlendirilmesinde ekspresyonda azalma tespit etmişlerdir (58). Aksine Goto ve ark. derlemelerinde prostat kanserli hastalardaki artmış hsa-miR-200c-3p ekspresyon düzeylerine dikkat çekmişlerdir (54). Çalışmamızda bulduğumuz hipotezimizin aksi sonuçlar AAM hastalarında hsa-miR-200c-3p regülasyon bozukluğunun altında yatan farklı moleküler mekanizmaların araştırılmasına öncü olabilir. ROCK2 dışında gen hedefleri ya da ek mekanizmaların aydınlatılabilmesi için çalışmalar genişletilmelidir.

Bir gen tek bir miRNA tarafından hedef alınmadığı gibi, her miRNA'nın da birden fazla hedef geni vardır (12). ROCK2 ve ARHGEF10 genlerini düzenleyen farklı miRNA'lar ya da bizim değerlendirdiğimiz miRNA'ların farklı genleri de hedefleyip düzenlemesi sonucu AAM hastalarında klinik bulgular farklı moleküler etkileşimlere bağlı ortaya çıkıyor olabilir.

AAM tedavisinde farklı tedavilere farklı yanıtlar alınması bize bu hastalarda kolinerjik sistemi farklı yollarla etkileyen ya da bu sistemden bağımsız mekanizmaların da hastalık kliniğine sebep olabileceğini gösterir. Hastalarda düzeylerinin azalmış olmasını beklediğimiz miRNA'ların artmış bulunması, hasta grubumuzun çoğunlukla antikolinerjik tedaviye de yanıtız kalacak grupta olabileceğini düşündürür.

AAM patofizyolojisinde rol alabilecek miRNA'ları araştıran az çalışma vardır. MiRNA etkilerini inceleyen çalışmalarda miR-21, miR-24, miR-25, miR-26a, miR-146a ve miR-155'in düz kas hücre farklılaşması ve kontraktıl proteinlerin sentezi ve düzenlenmesinde etkin görev alan miRNA'lar oldukları gösterilmiştir (77). Düz kasta etkili diğer miRNA'lar araştırıldığında, Chiba ve ark. miR-133a'nın düz kasta RhoA ekspresyonu üzerinden kasılmayı düzenlemesi rolü ile astım gibi patogenezinde hiperkontraktile olan hastalıklarda yeni bir tedavi seçeneği olabileceğini öne sürmüşlerdir (78). Kashyap ve ark. AAM'li rat modellerinde miR-132 ve miR-221'nin

regülasyonunun bozulduğunu bulmuşlar, AAM'li ratlarda miR-132'de aşırı ekspresyon gözlemişlerdir. Mesane hipertrofisi ve disfonksiyonunda bu miRNA'nın etkili olduğunu savunmuşlardır (79). Zhang ve ark. çalışması AAM hastalarının mesane dokularında artmış miRNA ekspresyonunu bildiren ilk çalışmadır. AAM hastalarının mesane dokularında sağlıklı kontrollere kıyasla hsa-miR-34a artışı bulmuşlardır. Ayrıca siklofosfamid ile oluşturulan Dicer (miRNA işleme için gerekli RNaz III enzimi) enzim defektli AAM'li farelerde miR-34a ifadesini incelemişler, miR-34a'nın, purinerjik sinyal yolağını düzenleyerek AAM'ye yatkınlığı artırdığı sonucuna varmışlardır (80). J. Chermansky ve ark. AAM'li hastalarda azalmış miR-221 ekspresyon seviyelerinin NGF etkisini bozarak mesane boşalmasını azalttığını, yüksek miR-125b ekspresyon düzeylerinin de inflamatuvar ve fibrotik araçların ekspresyonunu azaltarak mesane boşalmasının bozulmasında moleküler etkilerinin olabileceğini savunmuşlardır (81). Cordes ve ark. düz kas hücrelerinde yaptıkları çalışmada düz kas hücre farklılaşmasında ana role sahip miRNA'lar olarak kabul edilen miR-143 ve miR-145'in miyokardın proteininin ekspresyonunu artırarak düz kas tonusunu düzenlediğini göstermişler, Imamura ve ark. da mesane düz kasında yüksek oranda bulunan miR-1'in, miR-1-miyokardın yolağı ile düz kas kasılmasını azaltması rolü ile AAM'de yeni bir tedavi hedefi olabileceğini savunmuşlardır (82, 83). Yapılan hayvan çalışmaları ve klinik araştırmalar, miRNA'ları AAM tedavisi için potansiyel biyobelirteçler olarak incelemeye olan ilgiyi artırmıştır.

Çalışmamızda, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-142-3p ve hsa-miR-200c-3p 'nin ROC analizleri anlamlı çıktığı için bu miRNA'ların AAM tanısında yardımcı parametreler olarak kullanılacaklarını söyleyebiliriz. ROC eğrilerine göre tanısal potansiyelin en yüksek olduğu, ADRB3 genini hedef alan hsa-miR-98-5p, tek başına AAM hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırmada iyi bir etkinlik sağlayabilir (AUC: 0,799). Hsa-miR-98-5p'in tanısal performansı kabul edilebilir aralıktadır (23) Hsa-miR-98-5p'in tek başına bu tanısal performansı tatmin edici olmakla birlikte hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonu tanısal yeterlilikte daha yüksek performans göstermektedir (AUC: 0,839).

AAM tanısı için kandaki miRNA düzeyi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. NGF, ATP, BDNF gibi biyokimyasal biyobelirteçlerle ilgili yapılan çalışmalarda da tutarlı sonuçlar gözlenmemiştir (84-86). Duyarlılık eğrisi olarak da bilinen ROC eğrisi, yaygın olarak tanı testinin değerlendirme yöntemi olarak kabul edilir. Aynı zamanda değişkenlerin duyarlılığını ve özgüllüğünü yansıtan bir göstergedir. AUC değeri testin tanı amaçlı kullanılabilme potansiyeli ile orantılıdır (87). Günümüzde AAM tanısında en fazla kullanılan yöntem olan AAM semptom skoru için AUC değeri, Fei-Chi ve ark. son yaptıkları çalışmada 0,842, Arbillaga ve ark.'nın çalışmasında da 0,78 olarak bulunmuştur (23, 88). Hali hazırda AAM tanısı için kullanılmakta olan AAM semptom skoru ile hsa-miR-98-5p'nin tanısal performansları benzerdi. Hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonu tanısal yeterlilikte daha yüksek performans göstermektedir (AUC: 0,839, Duyarlılık: %84, Özgüllük: %86,5). AAM tanısı için kullanılacak diğer yardımcı tanısal parametrelerle ilgili kabul edilebilir AUC değerleri Lopes ve ark. çalışmasında BDNF için 0,78, Suh ve ark. çalışmasında NGF için 0,741, Ramos ve ark. çalışmasında ATP için 0,741 bulunmuştur (84-86). Hsa-miR-98-5p'nin tanısal potansiyeli bunlardan yüksektir. Bu sonuçlara göre plazma hsa-miR-98-5p göreceli ekspresyon düzeyleri AAM tanısında 0,1091 kestirim değeri için % 94,3 duyarlılık ve % 62,3 özgüllük ile etkili bir tanısal performans gösterir. Bulgular değerlendirildiğinde tek başına hsa-miR-98-5p ya da hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonu AAM tanısında etkili yardımcı parametreler olarak kullanılabilir.

Çalışmamızda hsa-let-7b-5p, hsa-mir-92a-3p, hsa-mir-139-5p ve hsa-mir-142-3p için bulunan AUC değerleri sırasıyla 0,625, 0,615, 0,614, 0,637 ve 0,625'tir. Bu miRNA'lar için en düşük duyarlılık değeri %71 (hsa-mir-142-3p için) olmasına rağmen AAM tanısında ayırt edicilikleri zayıftır. Bu değerlere benzer şekilde NGF için Lopes ve ark. ile Viyaja ve ark. zayıf ayırt edicilik değerleri saptamışlardır (84, 89). Suh ve ark. da ATP için zayıf ayırt edicilik potansiyeli bulmuşlardır (85). Bu sonuçlara göre hsa-let-7b-5p, hsa-mir-92a-3p, hsa-mir-139-5p ve hsa-mir-142-3p AAM mesane tanısında zayıf ayırt edicilik potansiyelleri ile kullanılabilirler, fakat etkileri düşüktür.

Çalışmamızda altı miRNA ve AAM semptom skoru arasında korelasyon bulunmamıştır. Tanıda ayırt edicilikleri olmasına rağmen, miRNA göreceli

ekspresyon düzeylerinin klinik bulguların şiddetiyle korelasyon göstermemesi prognoz ya da tedaviye yanıtın takibi ile ilgili bir yorum yapmamızı zorlaştırır.

Çalışmamızda ADRB3 geninde Trp64Arg (rs4994) polimorfizmi %20 oranında saptandı fakat sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı bir genotipik farklılık ya da allel sıklığı bulunmadı. Aynı zamanda hasta grupta Trp64Arg polimorfizmi ile hastalığın klinik şiddetinin gösteren AAM semptom skoru arasında korelasyon saptanmadı. ADRB3 geninde Trp64Arg polimorfizmi Kafkas popülasyonunda yaklaşık %8-10, Japon popülasyonunda %20, Alaska Eskimolarında ise % 40 sıklıkta bildirilmiştir (90). Bu polimorfizmin moleküler etkileri birçok hücre kültürü çalışmasında değerlendirilmiş, polimorfik reseptörün atasal tipe göre cAMP oluşturma kapasitesinin azalmış olduğu belirtilmiştir (91, 92). Dolayısıyla söz konusu moleküler etki klinikte sağlıklı kişilere göre daha az gevşeme fonksiyonu olarak görülebilir. Son zamanlarda Trp64Arg polimorfizmi mesane kanseri gibi alt üriner sistem hastalıkları ile birlikte abdominal obezite, insülin direnci, artmış beden kütle indeksi, gestasyonel diyabetes mellitus, hipertansiyon ve artmış kan basıncı, tip 2 diyabet gibi çeşitli hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir (93-99). Bununla birlikte Ferreire ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da Brezilya popülasyonunda Trp64Arg polimorfizmi ile AAM sendromu arasında ilişki saptanmıştır (4). Bunların aksine Teitsma ve ark. alt üriner sistem semptomları olan 1000'den fazla erkek hastada β 3 adrenerjik reseptör genindeki genotip ve ürodinamik özellikler arasındaki ilişkiyi incelemişler ve buldukları sonuçlar, β 3 adrenerjik reseptör genindeki polimorfizmlerin mesane fonksiyonundaki değişikliklerle ilişkili olduğu hipotezini desteklememiştir (9). Honda ve ark. β 3 adrenerjik reseptör genindeki Trp64Arg polimorfizminin AAM sendromu ile zayıf fakat anlamlı bir şekilde ilişkili olduğunu göstermişlerdir (7). H.C. Qu ve ark. yaptıkları metaanalizde de 2 bağımsız çalışmadan toplam 149 AAM'li ve 270 sağlıklı kontrol bireyini dahil etmişler ve Trp64Arg polimorfizmi ile AAM riski arasındaki ilişkiyi incelemişler ve önceki çalışmaların sonuçlarına benzer şekilde, bu polimorfizmin AAM riskini artırabildiğini göstermişlerdir (100). Serhat G. ve ark.'nın Türk pediatrik AAM hastalarında aynı polimorfizmi araştırdığı, hasta ve kontrol grubu arasında genotipik olarak fark saptamadıkları çalışmaları da polimorfik yapının popülasyonlar arasında farklılık gösterdiğini destekleyen sonuçlar ortaya koymuştur (35). Literatür ve çalışmamız birlikte değerlendirildiğinde polimorfizme sahip olan

sağlıklı kadınlarda mutasyona uğramış reseptörlerin neden olabileceği yetersiz gevşemeyi telafi etmek için farklı mekanizmalar olabileceğini düşünebiliriz. Polimorfik yapılar farklı toplumlarda farklı sıklık ve etkilere sahip olabilirler.

ARHGEF10 ve ROCK2 genlerindeki polimorfizmler kasılma fonksiyonunda artışa ve AAM semptomlarına sebep olabilir.

Çalışmamızda ARHGEF10 geninde hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımı ve allelik dağılım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Aynı zamanda AAM semptom skoru ile ARHGEF10 genindeki rs4376531 polimorfizmi arasında korelasyon saptanmadı. AAM semptom skoru açısından heterozigot polimorfik genotipteki hastaların ortalama değerleri yüksek olmasına rağmen polimorfik yapıda olan ve olmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. ROCK2 için AAM hastaları ve kontrol grubu karşılaştırıldığında genotipik ve allelik dağılım açısından fark bulunmadı. Heterozigot polimorfik genotipe sahip olan hastaların AAM skoru homozigot polimorfik genotipinde olanlardan anlamlı olarak yüksekti.

GEF proteinini kodlayan ARHGEF10 geninin polimorfizmi vücuttaki birçok patolojik olayda araştırılmış ve düz kas kasılmasında görevli olması sebebiyle özellikle de iskemik inme üzerine odaklanılmıştır (29, 31). Matsushita ve ark. yaptıkları geniş vaka-kontrol çalışmasında aterotrombotik atak geçiren 2775 olguyu 2839 kontrol olgusuyla karşılaştırmışlar ve ARHGEF10 ile ilgili dört farklı SNP değerlendirmişlerdir. Bizim de çalıştığımız rs4376531 ARHGEF10 polimorfizminin ARHGEF10 geninin transkripsiyonel aktivitesini etkilediğini ortaya koymuşlardır. Bunun sonucunda rs4376531'in RhoA aktivitesini özellikle artırdığını ve düz kas kasılmasını artırarak dokuda iskemi yaratması sebebiyle iskemik inmenin insidansını artırdığını tespit etmişlerdir (31). Robert Y. ve ark. da 23,294 sağlıklı Kafkas kadını 15 yıl boyunca izlemiş ve 323'ünde gelişen iskemik inme ile rs4376531 polimorfizminin ilişkili olabileceği sonucuna varmışlardır.²⁹ Çalışmamız değerlendirildiğinde ARHGEF10 genindeki polimorfik yapı hastalığın klinik şiddetini çok belirgin olmasa da artırır. Bu gende polimorfizme sahip olan hastaların antikolinergik tedaviye yanıtları değerlendirilip polimorfizm etkisi daha net ortaya

konabilir. Çalışmalardaki farklı sonuçlar polimorfizmlerin farklı etnik kökenlerde ve farklı hastalıklarda etkilerinin farklı olabileceğini düşündürmektedir.

Kandabashi ve ark yaptıkları hayvan çalışmasında hipertansif rat modeli oluşturarak ROCK2'nin artmış regülasyonunu koroner spazm ortaya çıkması ile desteklemişlerdir (101). Diğer yandan, ROCK2'nin medikal ajanlarla inihibisyonu çeşitli hipertansiyonlu hayvan modellerinde normotansiyona sebep olmuştur (102, 103). Priyanka P. ve ark. Hindistan popülasyonunda yaptıkları çalışmada esansiyel hipertansiyon ve ROCK2 rs2230474 polimorfizmi ilişkisini araştırmış ve ikisi arasında yüksek ilişki saptamışlardır (104). Lei Liu ve ark. Çin'li hastalarda yaptıkları çalışmada ROCK2 polimorfizminin kan basıncı ve hipertansiyon üzerine etkisi olmadığı sonucuna varmışlar, etnik kökenin çalışma sonuçlarını etkileyebileceğini vurgulamışlardır (105). Benzer şekilde Sang-Yong Yoo ve ark. Kore'li vazospastik anjinalı hastalarda ROCK2 polimorfizminin patogeneze etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır (106). ROCK2'nin kasılmayla ilişkisi çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiş ve oldukça çelişkili sonuçlar ortaya çıkmıştır. Çalışma sonuçlarımız değerlendirildiğinde ROCK2 genindeki rs2230474 polimorfizmi hastalığın ortaya çıkması ile değil hastalığın klinik şiddeti ile ilişkili olabilir. Heterozigot polimorfik genotipte olmak hastalığın klinik şiddetini artırmaktadır. Bu iki hasta grubunun antikolinerjik tedaviye verecekleri yanıtlar üzerine çalışılarak hastaların gereksiz ilaç kullanımı ve maruz kaldıkları yan etkiler önlenabilir. Farklı genotipik yapıdaki hastaların tedaviye verecekleri yanıtlar öngörülerek polimorfizm yapısına göre farklı seçenekler ile tedaviye yanıt oranı artırılabilir.

AAM hastalarında az sayıda çalışma yapılmış olduğundan mevcut kanıtlar sınırlı kalmaktadır ve aynı zamanda çalışmamız erişkin AAM hastalarında ülkemizde yapılan ilk polimorfizm ve miRNA araştırması olması sebebiyle bulunan sonuçların etnik köken, cinsiyet gibi faktörlerden etkilenebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca polimorfizmlerin etkilerinin kişiden kişiye değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, sonuçlarımızı doğrulamak için daha fazla sayıda örnekle ve standardize edilmiş daha büyük çalışmalara ihtiyaç vardır.

Verilerimizin hastalarda antikolinerjik tedavi sonrası değerlendirilmesi ve daha büyük örneklerle desteklenmesi yararlı olacaktır. Bu sayede AAM

fizyopatolojisindeki kolinerjik yolak ve bu yolaktan bağımsız olası moleküler sinyal mekanizmaları aydınlatılabilecek ve antikolinerjik tedaviye yanıt veremeyeceği öngörülebilecek olan hastaların gereksiz antikolinerjik kullanımı ile bunların yan etkilerine maruz kalmalarının önüne geçilebilecek, kişiye özel daha özgül tedavi stratejilerinin ortaya çıkmasının, tedavi takibinde kullanılabilecek yeni biyobelirteçlerin keşfedilmesinin önü açılacaktır. Bu konuyla ilgili gelecekteki doğrulama adımları asemptomatik sağlıklı toplumda referans aralık belirlemeye kadar gidebilecektir. MiRNA'ları ve hedef genlerin bağlantılarını belirlemek hastalığın ilerleyişi, düz kas dokusunun patolojik olarak yeniden şekillenmesinin önlenmesi veya tersine çevrilmesi için yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesini amaçlayan translasyonel araştırmalar üzerinde yüksek etkiye sahip olacaktır.

SONUÇLAR

- Çalışmaya katılan hasta ve kontrol bireyleri arasında yaş, boy, kilo, BMI açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.
- ADRB3 geni için hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımı ve allelik dağılım bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.
- ARHGEF10 geni için hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımı ve allelik dağılım bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.
- ROCK2 geni için hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımı ve allelik dağılım bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.
- ADRB3 geni için farklı genotipler arasında AAM semptom skoru açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı.
- ARHGEF10 geni için farklı genotipler arasında AAM semptom skoru açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı.
- ROCK2 geni için AAM skoru açısından homozigot atasal ile homozigot polimorfik ve homozigot atasal ile heterozigot polimorfik genotipleri arasında anlamlı fark bulunmazken, heterozigot polimorfik genotipe sahip olanların AAM semptom skoru homozigot polimorfik genotipinde olanlardan anlamlı olarak yüksekti ($p=0,039$).
- Hastalardaki göreceli miRNA ekspresyonları ile AAM skorları arasında anlamlı bir korelasyon saptanmazken analizi yapılan tüm miRNA'ların göreceli ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdi.
- Hsa-let-7b-5p göreceli ekspresyon düzeyleri hasta grupta kontrol grubuna göre 2,07 kat artmıştı ve anlamlı olarak yüksekti ($p=0,021$).
- Hsa-miR-92a-3p göreceli ekspresyon düzeyleri hasta grupta kontrol grubuna göre 1,05 kat artmıştı anlamlı olarak yüksekti ($p=0,046$).

- Hsa-miR-98-5p göreceli ekspresyon düzeyleri hasta grupta kontrol grubuna göre 2,93 kat artmıştı ve anlamlı olarak yüksekti ($p=0,0001$).
- Hsa-miR-139-5p göreceli ekspresyon düzeyleri hasta grupta kontrol grubuna göre 1,46 kat azalmıştı ve anlamlı olarak düşüktü ($p=0,039$).
- Hsa-miR-142-3p göreceli ekspresyon düzeyleri hasta grupta kontrol grubuna göre 1,49 kat artmıştı ve anlamlı olarak yüksekti ($p=0,011$).
- Hsa-miR-200c-3p göreceli ekspresyon düzeyleri hasta grupta kontrol grubuna göre 2,03 kat artmıştı ve anlamlı olarak yüksekti ($p=0,004$).
- Her bir miRNA için yapılan ROC analizi, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-142-3p ve hsa-miR-200c-3p için anlamlı idi.
- Hsa-let-7b-5p için $AUC=0,625$ ($p=0,021$) ve kestirim değeri olan 0,2568'de, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 78,6 ve % 50,8 idi.
- Hsa-miR-92a-3p için $AUC=0,615$ ($p=0,046$) ve kestirim değeri olan 33,37'de, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 92 ve % 38,5 idi.
- Hsa-miR-139-5p için $AUC=0,614$ ($p=0,039$) ve kestirim değeri olan 0,1772'de, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 62,3 ve % 63,9 idi.
- Hsa-miR-142-3p için $AUC=0,637$ ($p=0,011$) ve kestirim değeri olan 2,7983'te, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 71,4 ve % 55,9 idi.
- Hsa-miR-200c-3p için $AUC=0,625$ ($p=0,004$) ve kestirim değeri olan 0,0326'da, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 86,4 ve % 45,1 idi.
- Hsa-miR-98-5p için $AUC=0,799$ ($p=0,0001$) ve kestirim değeri olan 0,1091'de, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 94,3 ve % 62,3 idi. Çalışılan miRNA'lar arasında tek başına en etkili ayırt edicilik hsa-miR-98-5p için saptandı.
- Hsa-let-7b-5p+hsa-miR-98-5p kombinasyonu için $AUC=0,801$ (%95 GA: 0,711 – 0,891; $p=0,0001$; Duyarlılık= %92,5, Özgüllük= %66) idi.

- Hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonu için AUC=0,839 (%95 GA: 0,750 – 0,929; p=0,0001; Duyarlılık= %92,5, Özgüllük= %66) idi. En yüksek tanısal yeterlilik bu kombinasyonda bulundu.
- Hsa-let-7b-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonu için ROC eğrisi analizi anlamsızdı (AUC=0,578).
- Hsa-let-7b-5p+hsa-miR-98-5p+hsa-miR-139-5p kombinasyonu için AUC=0,836 (%95 GA: 0,746 – 0,926; p=0,0001; Duyarlılık= % 84, Özgüllük= % 85,6) idi.



KAYNAKLAR

1. Demirci DA. Aşırı Aktif Mesanenin Patofizyolojisi. Turk Urol Sem. 2010;1:23-26.
2. Irwin DE, Kopp ZS, Agatep B, Milsom I, Abrams P. Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction. BJU Int. 2011;108:1132-1139.
3. Zumrutbas AE, Bozkurt AI, Tas E, et al. Prevalence of lower urinary tract symptoms, overactive bladder and urinary incontinence in western Turkey: Results of a population-based survey. Int J Urol. 2014;21(10):1027-1033.
4. Ferreira C, Fonseca A, Silva I, Giro M, Sartori M, Castro R. The relationship between the Trp 64 Arg polymorphism of the beta 3-adrenoceptor gene and idiopathic overactive bladder. Am J Obstet Gynecol. 2011;205(1):82.e10-82.e14.
5. Yoshimura N, Chancellor MB. Neurophysiology of Lower Urinary Tract Function and Dysfunction. Rev Urol. 2003;5(Suppl 8):S3-S10.
6. Gurocak S, Konac E, Ure I, et al. The Impact of Gene Polymorphisms on the Success of Anticholinergic Treatment in Children with Overactive Bladder. Dis Markers. 2015;2015:1-6.
7. Honda K, Yamaguchi O, Nomiya M, et al. Association Between Polymorphism of Beta3-Adrenoceptor Gene and Overactive Bladder. Neurourol Urodyn. 2014;33:400-402.
8. Vrydag W, Alewijnse AE, Michel MC. Do gene polymorphisms alone or in combination affect the function of human beta 3-adrenoceptors? Br J Pharmacol. 2009;156:127-134.
9. Teitsma C, Rosette J, Michel M. Are Polymorphisms of the B3-Adrenoceptor Gene Associated With an Altered Bladder Function? Neurourol Urodyn. 2013;32:276-280.
10. Alkis O, Zumrutbas A, Toktas C, Aybek H, Aybek Z. The Use of Biomarkers in the Diagnosis and Treatment of Overactive Bladder: Can We Predict the Patients Who Will be Resistant to Treatment? Neurourol Urodyn. 2015:DOI 10.1002/nau.22939.
11. Çelik DA, Koşar PA, Özçelik N. MikroRNA'lar ve Kansere İlişkisi. SDÜ Tıp Fakültesi Derg. 2013;20(3):121-127.

12. Igaz P. *Circulating microRNAs in Disease Diagnostics and Their Potential Biological Relevance*, Springer, Hungary, Peter Igaz. Vol *Experienti.*; 2015.
13. Cortez MA, Bueso-ramos C, Ferdin J, Lopez-berestein G, Anil K, Calin GA. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;8(8):467-477.
14. Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, et al. Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol.* 2018;233(3):2007-2018.
15. Kavitha N, Vijayarathna S, Jothy SL, et al. MicroRNAs: Biogenesis, roles for carcinogenesis and as potential biomarkers for cancer diagnosis and prognosis. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;15(18):7489-7497.
16. Shah AP, Mevcha A, Wilby D, et al. Continence and micturition: An anatomical basis. *Clin Anat.* 2014;27:1275-1283.
17. Sivrioğlu K. Bladder Anatomy and Physiology of Micturition. *Turk J Phys Med Rehab.* 2005;51(Suppl A):A16-A18.
18. fizikom.<http://www.fizikom.com.tr/omurilik-yaralanmalari> Son erişim tarihi:27.03.2018.
19. Tekin A. İşeme fizyolojisi ve işemenin nöral kontrolü. *Çocuk Cerrahisi Derg.* 2016;30(Ek sayı 6):545-549.
20. Grape H, Dederig A, Jonasson A. Overactive Bladder and the Definition of Urgency. *Neurourol Urodyn.* 2007;26:757-758.
21. En M, Wei L, Wei L, Yao-Chi C. Pathophysiology of overactive bladder. *LUTS.* 2012;4:48-55.
22. Hashim H, Abrams P. Overactive bladder: an update. *Curr Opin Urol.* 2007;17:231-236.
23. Chuang FC, Hsiao SM, Kuo HC. The overactive bladder symptom score, international prostate symptom score-storage subscore, and urgency severity score in patients with overactive bladder and hypersensitive bladder: Which scoring system is best? *Int Neurourol J.* 2018;22(2):99-106.
24. Linked in.<https://www.slideshare.net/mbolmez/ieme-bozukluklar-ve-nrojenik-mesane> Son erişim tarihi:27.03.2018.
25. Chess-Williams R. Muscarinic receptors of the urinary bladder: Detrusor, urothelial and prejunctional. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2002;22(3):133-145.
26. Chapple CR, Yamanishi T, Chess-Williams R. Muscarinic receptor subtypes and management of the overactive bladder. *Urology.* 2002;60(Suppl 5A):82-89.

27. Kawano Y, Yoshimura T, Kaibuchi K. Smooth muscle contraction by small GTPase Rho. *Nagoya J MedSci.* 2002;65:1-8.
28. Park CS. Rho-Associated Kinase 2 Polymorphism of Vasospastic Angina in Korean Population(Editorial). *Korean Circ J.* 2012;42(6):379-381.
29. Zee R, Wang Q, Chasman D, Ridker P, Liao J. Gene variations of ROCKs and risk of ischaemic stroke: the Women's Genome Health Study. *Clin Sci.* 2014;126(12):829-835.
30. The National Center for Biotechnology Information (ncbi).<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/403387/Son> erişim tarihi: 27.03.2018.
31. Matsushita T, Ashikawa K, Yonemoto K, et al. Functional SNP of ARHGEF10 confers risk of atherothrombotic stroke. *Hum Mol Genet.* 2010;19(6):1137-1146.
32. Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology.* 2009;24:342-356.
33. The National Center for Biotechnology Information (ncbi).<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/156013/> Son erişim tarihi:27.03.2018.
34. Yamaguchi O, Chapple C. B3-Adrenoceptors in Urinary Bladder (Editorial). *Neurourol Urodyn.* 2007;26:752-756.
35. Gürocak S. Aşırı Aktif Mesaneli Çocuklardaki Gen Polimorfizmlerinin Antikolinergik Tedaviye Etkisi (Doktora Tezi).Ankara,Gazi Üniversitesi.; 2013.
36. Verdi H, Kınık ST, Yalçın YY, Şahin NM, Ataç B, Yazıcı AC. β -3AR W64R Polymorphism and 30-Minute Post-Challenge Plasma Glucose Levels in Obese Children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2015;7(1):7-12.
37. GeneCards Human Gene Database.http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADRB3#genomic_location Son erişim tarihi:27.03.2018.
38. Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, et al. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol.* 2006;148(5):565-578.
39. Hsiao S, Lin H, Kou H. Factors Associated With a Better Therapeutic Effect of Solifenacin in Patients With Overactive Bladder Syndrome. *Neurourol Urodyn.* 2014;33:331-334.

40. Kelleher C, Hakimi Z, Zur R, et al. Efficacy and Tolerability of Mirabegron Compared with Antimuscarinic Monotherapy or Combination Therapies for Overactive Bladder: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Eur Urol*. 2018;(7784):1-10.
41. Osman NI, Chapple CR. Overactive bladder syndrome: Current pathophysiological concepts and therapeutic approaches. *Arab J Urol*. 2013;11(4):313-318.
42. Marcelissen T, Cornu JN, Antunes-Lopes T, et al. Management of Idiopathic Overactive Bladder Syndrome: What Is the Optimal Strategy After Failure of Conservative Treatment? *Eur Urol Focus*. 2018;505:1-8.
43. Yoshida M, Kato D, Nishimura T, Van Schyndle J, Uno S, Kimura T. Anticholinergic burden in the Japanese elderly population: Use of antimuscarinic medications for overactive bladder patients. *Int J Urol*. 2018:1-8.
44. Marcelissen TAT, Van Koeveeringe GA. Mirabegron versus Antimuscarinics in the Treatment of Overactive Bladder: The Final Answer? *Eur Urol*. 2018:18-19.
45. Kaikkonen MU, Lam MTY, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res*. 2011;90(3):430-440.
46. Güzelgöl F, Aksoy K. Kodlanmayan Rna ' ların İşlevi v e Tıppda Kullanım Alanları. arşiv. 2009:141-155.
47. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen March* 2011. 2011;717(1-2):1-8.
48. Yılmaz Ş. Alzheimer Hastalarında Bazı MikroRNA' ların İfadeleri ve Oluşum Yolağında Rol Oynayan Genlerin Polimorfizmlerinin Araştırılması Doktora Tezi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü.
49. De Planell-Saguer M, Rodicio MC. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review. *Anal Chim Acta*. 2011;699(2):134-152.
50. Kappel A, Keller A. MiRNA assays in the clinical laboratory: Workflow, detection technologies and automation aspects. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(5):636-647.
51. De Planell-Saguer M, Rodicio MC. Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clin Biochem*. 2013;46(10-11):869-878.
52. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR." *Turkiye Klin J Med Sci*. 2007;27:763-767.

53. Keçeoğlu Ç, Gelbal S, Doğan N. ROC Eğrisi Yöntemi ile Kesme Puanının Belirlenmesi. *Int J Soc Sci.* 2016;50:553-562.
54. Goto Y, Kurozumi A, Enokida H, Ichikawa T, Seki N. Functional significance of aberrantly expressed microRNAs in prostate cancer. *Int J Urol.* 2015;22:242-253.
55. Knyazev EN, Fomicheva KA, Mikhailenko DS, et al. Plasma Levels of hsa-miR-619-5p and hsa-miR-1184 Differ in Prostatic Benign Hyperplasia and Cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2016;161(1):108-111.
56. Kara M, Kaplan M, Bozgeyik I, et al. MTUS1 tumor suppressor and its miRNA regulators in fibroadenoma and breast cancer. *Gene.* 2016;587:173-177.
57. Vishnubalaji R, Hamam R, Abdulla MH, et al. Genome-wide mRNA and miRNA expression profiling reveal multiple regulatory networks in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2015;6(e1614):1-11.
58. Zhang W, Shang T, Huang C, et al. Plasma microRNAs serve as potential biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Clin Biochem.* 2015;48:988-992.
59. Slattery ML, Herrick JS, Mullany LE, et al. An evaluation and replication of miRNAs with disease stage and colorectal cancer-specific mortality. *Int J Cancer.* 2015;137:428-438.
60. Wang Y, Bao W, Liu Y, et al. MIR-98-5p contributes to cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer by suppressing miR-152 biogenesis via targeting Dicer1. *Cell Death Dis.* 2018;9(447):1-17.
61. Zhou H, Huang Z, Chen X, Chen S. miR-98 inhibits expression of TWIST to prevent progression of non-small cell lung cancers. *Biomed Pharmacother.* 2017;89:1453-1461.
62. Fu Y, Liu X, Chen Q, et al. Downregulated miR-98-5p promotes PDAC proliferation and metastasis by reversely regulating MAP4K4. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(130):1-14.
63. Matin F, Jeet V, Moya L, et al. A Plasma Biomarker Panel of Four MicroRNAs for the Diagnosis of Prostate Cancer. *Sci Rep.* 2018;8:1-15.
64. Marques FZ, Vizi D, Khammy O, Mariani JA, Kaye DM. The transcardiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(8):1000-1008.
65. Kim BS, Jung JY, Jeon JY, Kim HA, Suh CH. Circulating hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-92a-3p, and hsa-miR-223-3p may be novel biomarkers in systemic lupus erythematosus. *Hla.* 2016;88(4):187-193.

66. Rong X, Jia L, Hong L, et al. Serum miR-92a-3p as a New Potential Biomarker for Diagnosis of Kawasaki Disease with Coronary Artery Lesions. *J Cardiovasc Transl Res.* 2017;10:1-8.
67. Ratert N, Meyer HA, Jung M, et al. MiRNA profiling identifies candidate mirnas for bladder cancer diagnosis and clinical outcome. *J Mol Diagnostics.* 2013;15(5):695-705.
68. Yonemori M, Seki N, Yoshino H, et al. Dual tumor-suppressors miR-139-5p and miR-139-3p targeting matrix metalloprotease 11 in bladder cancer. *Cancer Sci.* 2016;107:1233-1242.
69. Wong CC, Wong C, Tung EK, et al. The MicroRNA miR-139 suppresses metastasis and progression of hepatocellular carcinoma by down-regulating rho-kinase 2. *Gastroenterology.* 2011;140:322-331.
70. Urquidi V, Netherton M, Gomes-Giacoia E et al. A microRNA biomarker panel for the non-invasive detection of bladder cancer. *Oncotarget.* 2016;7(52):86290-86299.
71. Mengual L, Lozano JJ, Ingelmo-Torres M, Gazquez C, Ribal MJ, Alcaraz A. Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer. *Int J Cancer.* 2013;133:2631-2641.
72. Toro R, Blasco-Turrión S, Morales-Ponce FJ, et al. Plasma microRNAs as biomarkers for Lamin A/C-related dilated cardiomyopathy. *J Mol Med.* 2018;96:845-856.
73. Bibi F, Naseer MI, Alvi SA, et al. microRNA analysis of gastric cancer patients from Saudi Arabian population. *BMC Genomics.* 2016;17(Suppl 9):52-60.
74. He Y, Lin J, Kong D, et al. Current state of circulating microRNAs as cancer biomarkers. *Clin Chem.* 2015;61(9):1-18.
75. Liu L, Qiu M, Tan G, et al. MiR-200c Inhibits invasion, migration and proliferation of bladder cancer cells through down-regulation of BMI-1 and E2F3. *J Transl Med.* 2014;12:1-10.
76. Zhou H, Tang K, Xiao H, et al. A panel of eight-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015;34:1-12.
77. Joshi SR, Comer BS, McLendon JM, Gerthoffer WT. MicroRNA Regulation of Smooth Muscle Phenotype. *Mol Cell Pharmacol.* 2012;4(1):1-16.
78. Chiba Y, Tanabe M, Goto K, Sakai H, Misawa M. Down-regulation of miR-133a contributes to up-regulation of RhoA in bronchial smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:713-719.

79. Kashyap M, Pore S, Chancellor M, Yoshimura N, Tyagi P. Bladder overactivity involves overexpression of MicroRNA 132 and nerve growth factor. *Life Sci.* 2016;167:98-104.
80. Zhang S, Lv JW, Yang P, et al. Loss of dicer exacerbates cyclophosphamide-induced bladder overactivity by enhancing purinergic signaling. *Am J Pathol.* 2012;181(3):937-946.
81. Chermansky C, Kadow B, Kashyap M, Tyagi P. MicroRNAs as potential biomarkers to predict risk of urinary retention following intradetrusor on abotulinumtoxin-a injection. *Neurourol Urodyn.* 2018;37:99-105.
82. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, et al. MiR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature.* 2009;460:705-710.
83. Imamura M, Sugino Y, Long X, et al. Myocardin and microRNA-1 modulate bladder activity through connexin 43 expression during post-natal development. *J Cell Physiol.* 2013;228:1819-1826.
84. Antunes-Lopes T, Carvalho-Barros S, Cruz CD, Cruz F, Martins-Silva C. Biomarkers in overactive bladder: A new objective and noninvasive tool? *Adv Urol.*:doi:10.1155/2011/382431.
85. Suh YS, Ko K, Kim TH, Sung HH, Choo M, Lee K. Potential Biomarkers for Diagnosis of Overactive Bladder Patients: Urinary Nerve Growth Factor, Prostaglandin E2, and Adenosine Triphosphate. *Int Neurourol J.* 2017;21:171-177.
86. Silva-Ramos M, Silva I, Oliveira O, et al. Urinary ATP May Be a Dynamic Biomarker of Detrusor Overactivity in Women with Overactive Bladder Syndrome. *PLoS One.* 2013;8(5):e64696.
87. Schisterman EF, Perkins NJ, Liu A, Bondell H. Optimal cut-point and its corresponding Youden index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiology.* 2005;16(1):73-81.
88. Arribillaga LC, Ledesma M, Montedoro A, Pisano F, Bengió RG. OAB score: A clinical model that predicts the probability of presenting overactive detrusor in the urodynamic study. *Int Braz J Urol.* 2018;44(2):348-354.
89. Vijeya G, Cartwright R, Bhide A, Derpapas A, Fernando R, Khullar V. Reliability and Validity of Urinary Nerve Growth Factor Measurement in Women With Lower Urinary Tract Symptoms. *Neurourol Urodyn.* 2015:1-5.
90. Arner P, Hoffstedt J. Adrenoceptor genes in human obesity. *J. Intern. Med.* 245: 667-672.

91. Kimura K, Sasaki N, Asano A, et al. Mutated human β 3-adrenergic receptor (Trp64Arg) lowers the response to β 3-adrenergic agonists in transfected 3T3-L1 preadipocytes. *Horm Metab Res* 2000;32:91–6.
92. Pietri-Rouxel F, St John Manning B, Gros J, et al. The biochemical effect of the naturally occurring Trp64 Arg mutation on human β 3- adrenoceptor activity. *Eur J Biochem* 1997;247:1174–79.
93. Clément K, Vaisse C, Manning BS, et al. Genetic variation in the β 3- adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med*. 1995;333:352-354.
94. Daghestani M, Daghestani M, Daghistani M, et al. ADRB3 polymorphism rs4994 (Trp64Arg) associates significantly with bodyweight elevation and dyslipidaemias in Saudis but not rs1801253 (Arg389Gly) polymorphism in ARDB1. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):1-9.
95. Guan L, Cui X, Zhou H. Meta-analysis of the association between the Trp64Arg polymorphism of the β -3 adrenergic receptor and susceptibility to gestational diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2018;38(2):172-176.
96. Yang H, Cai D, Zhu Q, Wu D, Wang Q, Wang Z. The mutation of Trp64Arg in β 3-adrenoreceptor-encoding gene is significantly associated with increased hypertension risk and elevated blood pressure: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(28):46480-46490.
97. Li YY, Lu XZ, Wang H, et al. ADRB3 gene Trp64Arg polymorphism and essential hypertension: A meta-analysis including 9,555 subjects. *Front Genet*. 2018;9(APR):1-10.
98. Farias G, Thieme RD, Teixeira LM, Heyde ME, Bettini S, Radominski R. Relation of Trp64Arg polymorphism of β 3 adrenoceptor gene with metabolic syndrome and insulin resistance in obese women. *Nutr Hosp*. 2016;33(5):1108-1115.
99. Rai R, Kim JJ, Misra S, Kumar A, Mittal B. A multiple interaction analysis reveals ADRB3 as a potential candidate for gallbladder cancer predisposition via a complex interaction with other candidate gene variations. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):28038-28049.
100. Qu HC, Zhang W, Liu YL, et al. Association between polymorphism of β 3- adrenoceptor gene and overactive bladder: a meta-analysis. *Genet Mol Res Mol Res*. 2015;14(1):2495-251.
101. Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, Kunihiro et al. Inhibition of myosin phosphatase by upregulated rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1 β . *Circulation* 2000;101:1319–1323.

102. Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T et al. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J* 2001;15:1062–1064.
103. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;389:990–994.
104. Pandey P, Mohammad G, Singh Y, Pasha MAQ. Polymorphisms and haplotype of ROCK2 associate with high altitude essential hypertension in native high altitude Ladakhi Indian population: A preliminary study. *Clin Exp Hypertens*. 2016;38(2):238-244.
105. Liu L, Cao Y, Cui G, et al. Association Analysis of Polymorphisms in ROCK2 with Cardiovascular Disease in a Chinese Population. *PLoS One*. 2013;8(1):26-28.
106. Yoo SY, Kim J, Cheong S, et al. Rho-Associated Kinase 2 Polymorphism in Patients With Vasospastic Angina. *Korean Circ J*. 2012;42(6):406.

EKLER

EK-1

AŞIRI AKTİF MESANE DEĞERLENDİRME FORMU(OAB- V8)

Aşağıdakiler sizi ne ölçüde rahatsız etmektedir?	Hiç	Çok az	Biraz	Epey	Çok	Çok fazla
Gündüz sık idrara çıkma	0	1	2	3	4	5
Rahatsız edici bir idrar sıkışması	0	1	2	3	4	5
Ani, beklenmedik bir idrar sıkışması	0	1	2	3	4	5
Kazara az miktarda idrar kaçırma	0	1	2	3	4	5
Gece idrara gitme	0	1	2	3	4	5
Gece idrar yapma ihtiyacı ile uyanma	0	1	2	3	4	5
Kontrol edilemez bir idrar sıkışması	0	1	2	3	4	5
Aşırı idrar yapma isteği ile birlikte idrar kaçırma	0	1	2	3	4	5
	TOPLAM PUAN:.....					
Eğer cinsiyetiniz ERKEK ise toplam puana 2 puan daha ekleyiniz	AAM Skoru:.....					