



**T.C.  
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**ADYAMAN İLİNDE AKUT KORONER SENDROM  
OLGULARINDA Mİ-RNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. ÖMER FARUK KARAÇORLU**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. HAYDAR BAĞIŞ**

**ADYAMAN - 2017**



**T.C.  
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**ADYAMAN İLİNDE AKUT KORONER SENDROM  
OLGULARINDA Mİ-RNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

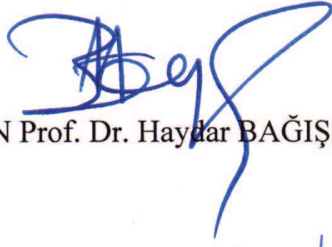
**UZMANLIK TEZİ  
DR. ÖMER FARUK KARAÇORLU**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. HAYDAR BAĞIŞ**

Bu çalışma Adiyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başkanlığının 01.12.2015 tarih ve 2015/05-10 sayılı kararı ile desteklenmiştir.

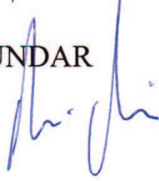
**ADYAMAN - 2017**

Prof. Dr. Haydar Bağış danışmanlığında Dr. Ömer Faruk Karaçorlu tarafından yapılan “Adıyaman İlinde Akut Koroner Sendrom Olgularında miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi ” başlıklı tez çalışması 02/05/2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.



BAŞKAN Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ

ÜYE Prof. Dr. Munis DÜNDAR




ÜYE Doç. Dr. Erdal AKTÜRK



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

02/05/2017



Prof. Dr. Ali AYDIN

Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik asistanlığım süresince ve Tıpta Uzmanlık eğitimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, örnek bilim insanlığının yanı sıra diğer yüksek insani değerlerinden de çokça istifade ettiğim, beni iyi bir hekim olmanın yanında iyi bir araştırmacı olma konusunda da her zaman büyük bir özveri ve sabırla teşvik eden çok kıymetli hocam, anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Haydar Bağış Beyefendiye şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmalarım sırasında değerli vakitlerini benimle paylaşan ve çok önemli katkıları olan Kardiyoloji bölümünden Doç. Dr. Mustafa Çetin, Dr. Sabri Abuş, Tekn. Cuma Pancar Bey ve anjiyografi ünitesinin diğer özverili çalışanlarına, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından Yrd. Doç. Dr. Önder Yumrutaş ve Arş. Gör. İbrahim Bozgeyik Beye ve istatistik konularında destek olan arkadaşlarım Dr. Esra Bozgeyik ve Arş. Gör. Ebru Dumlupınar Hanıma yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tıbbi Genetik Anabilim Dalında saygı ve sevgi içerisinde birlikte çalıştığım ve tanımaktan büyük mutluluk duyduğum Yüksek Kimyager Fadil Özhan, Dr. Hamide Saygılı, Uzm. Dr. İlker Güney, Yrd. Doç. Dr. M. Özgür Çevik, Lab. Tekniker Yusuf Göksu ve poliklinik sekreterimiz Yusuf Yıldırım Beye de bana olan destekleri için minnettarım.

Bugünlere gelmemde katkıları olan üzerimdeki haklarımı hiçbir zaman ödeyemeyeceğim beni yetiştiren tüm öğretmenlerime, arkadaşlarıma, meslektaşlarıma ve hocalarıma da teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen ve yanımda olan canlarım, ilk öğretmenlerim olan anneme ve babama, hayatıma renk katan kardeşlerim Ahmet Tarık ve Fatma Nur'a da ayrıca teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Ömer Faruk Karaçorlu

Adıyaman-2017

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI .....	III
TEŞEKKÜR .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XIII
TABLolar DİZİNİ .....	XV
ÖZET .....	XVI
SUMMARY.....	XVIII
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. KORONER ARTER HASTALIĞI VE AKUT KORONER SENDROM.....	3
2.1.1. Tanım ve Sınıflandırma.....	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	4
2.1.3. Etiyoloji.....	7
2.1.4. Tanı.....	11
2.2. MİKRO RNA.....	15
2.2.1. Tanım, tarihçe, sınıflandırma ve terminoloji.....	15
2.2.2. Mikro RNA Oluşum ve İşlev Mekanizmaları.....	18
2.2.3. Mikro RNA'ların Hastalıklardaki Rollerini.....	21
2.2.4. Mikro RNA'ların Tanı, Prognoz ve Tedavide Kullanımı.....	24

2.2.5. Kardiyovasküler Sistem ve Mikro RNA'lar.....	26
2.2.6. Mikro RNA'ların Koroner Arter Hastalığı ve Akut Koroner Sendromdaki Rolü.....	28
2.2.7. miRNA profilendirme.....	33
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>36</b>
3.1.ÇALIŞMA GRUBU.....	36
3.2.VERİ TOPLAMA ARAÇLARI.....	37
3.2.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler.....	37
3.2.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Kimyasallar.....	38
3.3. YÖNTEMLER.....	39
3.3.1. Serum Elde Edilmesi.....	39
3.3.2. RNA İzolasyonu.....	41
3.3.3. cDNA Dönüşümü.....	43
3.3.4. qRT-PCR (Quantitative Real Time-PCR, Eş Zamanlı-PCR)...	45
3.4.VERİLERİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ.....	49
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>51</b>
4.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ GENEL ÖZELLİKLERİ.....	51
4.2.EKSPRESYON ANALİZİ BULGULARI.....	52
4.2.1.Çalışma Gruplarının miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	52
4.2.2.Demografik Özelliklere ve Klinik Bulgulara Göre miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	54
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>64</b>

**6. SONUÇLAR ..... 74**

**7. KAYNAKLAR ..... 76**

**EKLER**

**EK 1.**

**EK 2.**



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>ACE:</i>	Angiotensin I Converting Enzyme
<i>ADAMTS7:</i>	A Disintegrin-Like And Metalloprotease (Reprolysin Type) With Thrombospondin Type 1 Motif, 7
<i>AGT:</i>	Angiotensinogen
<i>Ago2:</i>	Argonaute proteinleri 2
<i>AGTRI:</i>	Angiotensin II Receptor Type 1
<i>AH:</i>	Ailesel hiperkolesterolemi
<i>AHA:</i>	Amerikan Kalp Cemiyeti
<i>AKS:</i>	Akut Koroner Sendrom
<i>ANP:</i>	Atrial Natriüretik Peptid
<i>Anti-miR:</i>	AntagomiR (Mikro RNA'ların hedeflerine bağlanmalarını engelleyen sentetik miRNA antagonistleri)
<i>AP:</i>	Kararsız anjina (göğüs ağrısı)
<i>APOB:</i>	Apolipoprotein B geni
<i>APOE:</i>	Apolipoprotein E geni
<i>BNP:</i>	B-tip Natriüretik Peptid
<i>°C:</i>	Derece (celsius derece)
<i>CBS:</i>	Cystathionine-Beta-Synthase
<i>cDNA:</i>	Complementary (tamamlayıcı) DNA (Deoksiribo Nükleik Asit)
<i>CETP:</i>	Cholesteryl Ester Transfer Protein
<i>circRNA:</i>	Sirküler RNA, miRNA süngeri



CK-MB:	Kreatin kinaz-MB izoenzimi
CpGA:	Sitozin fosforile guanin adacığı (kanser ve mutasyon hotspot bölgesi)
CT:	Cycle treshold (döngü eğiği)
<i>DGCR8</i> :	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
<i>DICER1</i> :	Dicer 1, Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease
Dicer:	RNaz enzimi (RNA işlenmesinde görevli dupleks yapıyı ayırır)
DM:	Diabetes Mellitus
dNTP:	Deoksinükleotid trifosfat
Drosha:	RNaz enzimi (DGCR8 ile birlikte primer miRNA'ları prekürsör miRNA'lara çevirir)
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
ESC:	Avrupa Kardiyoloji Cemiyeti
<i>F13A</i> :	Faktör 13A geni
<i>F13B</i> :	Faktör 13B geni
<i>F2</i> :	Faktör 2 geni
<i>F5</i> :	Faktör 5 geni
<i>F7</i> :	Faktör 7 geni
<i>FGB</i> :	Fibrinojen beta zinciri geni
FGF2:	Fibroblast growth factor 2
GAX:	Growth Arrest-Specific Homeobox
GDF-15:	Büyüme Farklılaştırıcı Faktör-15
H-FABP:	Kardiyak Yağ asidi bağlayıcı protein

<i>HOXA5</i> :	Homeobox A5
HsCRP:	High sensitivity C-reactive protein
HT:	Hipertansiyon
<i>ICAM1</i> :	Intercellular Adhesion Molecule 1
<i>ITGA2B</i> :	Integrin Subunit Alpha 2b
<i>ITGB3</i> :	Integrin, Beta 3 (Platelet Glycoprotein IIIa, Antigen CD61)
KAH:	Koroner Arter Hastalığı
kb:	kilo baz (1000 adet nükleotid)
<i>KLF2</i> :	Kruppel Like Factor 2
<i>KLF4</i> :	Kruppel Like Factor 4
Kopeptin:	C-terminal-provazopressin
KVS:	Kardiyovasküler sistem
<i>LDLR</i> :	Low Density Lipoprotein Receptor
<i>LDLRAP1</i> :	Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1
lincRNA:	Long intergenic non-coding RNA
lncRNA:	Long non-coding RNA
<i>LPL</i> :	Lipoprotein Lipase
MI:	Miyokart enfarktüsü
miRNA:	Mikro Ribo Nükleik Asit
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
<i>MMP3</i> :	Matrix Metallopeptidase 3
<i>MMP9</i> :	Matrix Metallopeptidase 9

<i>MPO:</i>	Myeloperoxidase
mRNA:	Messenger (haberci) RNA (Ribo Nükleik Asit)
<i>MTHFR:</i>	Methylenetetrahydrofolate Reductase
ncRNA:	Kodlama yapmayan RNA
<i>NOS3:</i>	Nitric Oxide Synthase 3 (Endothelial Cell)
NTproBNP:	Pro BNP'nin N terminal kısmı
PaPPA:	Pregnancy-Associated Plasma Protein A, Pappalysin 1
<i>PCSK9:</i>	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9
<i>PI3KR2:</i>	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2
piwiRNA:	P-element induced wimpy testis proteini ile etkileşimli RNA
<i>PON1:</i>	Paraoxonase 1
<i>PROCR:</i>	Protein C Receptor, Endothelial
<i>PTPNI:</i>	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 1
qRT-PCR:	Niceliksel eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RISC:	RNA-indüklenmiş susturma kompleksi
<i>RNU6-6P:</i>	RNA, U6 Small Nuclear 6, Pseudogene
<i>SELE:</i>	Selectin E
<i>SERPINE1:</i>	Serpin Family E Member 1
<i>SIRT1:</i>	NAD-Dependent Protein Deacetylase Sirtuin-1 / Sirtuin (Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog) 1
siRNA:	Small interfering RNA
<i>SNORD61:</i>	Small Nucleolar RNA, C/D Box 61

snoRNA:	Small nucleolar RNA
snRNA:	Small nuclear RNA
ST2:	IL-1 reseptörü benzeri protein
STEMI:	ST segment elevasyonlu miyokart enfarktüsü
SYBR:	Synergy Brands, Inc. (qRT-PCR işleminde kullanılan floresan işaretleme boyasının ticari adı)
<i>TARBP2</i> :	Trans-Activation Responsive RNA-Binding Protein
<i>TIMP</i> :	Tissue inhibitor of metalloproteinase
<i>TNNI3</i> :	Troponin I3, Cardiac Type
<i>TNNT2</i> :	Troponin T2, Cardiac Type
TÜİK:	Türkiye İstatistik Kurumu
UTR:	Untranslated region (mRNA'nın translasyona uğramayan 3' ve 5' uç bölgeleri)
<i>VEGFA</i> :	Vascular Endothelial Growth Factor A
<i>XPO5</i> :	Exportin 5

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1:</b> Akut Koroner Sendrom Sınıflandırılması.....	4
<b>Şekil 2.2:</b> RNA'ların sınıflandırılmasında Mikro RNA'ların yeri.....	16
<b>Şekil 2.3:</b> Mikro RNA Oluşumu.....	19
<b>Şekil 2.4:</b> Mikro RNA'ların bağlanma bölgelerine uyumluluğuna göre işlevleri.....	20
<b>Şekil 2.5:</b> Mikro RNA'ların nörodejeneratif hastalıklardaki başlıca rolleri.....	22
<b>Şekil 2.6:</b> Normal ve hipertorfik kalpte miRNA'ların fonksiyonel rolü.....	27
<b>Şekil 2.7:</b> Vasküler sistemde miRNA'ların fonksiyonel rolü.....	29
<b>Şekil 2.8:</b> Anjiyogenezis üzerine etkili olduğu gösterilmiş başlıca miRNA'lar.....	30
<b>Şekil 2.9:</b> Kardiyovasküler sistem hastalıklarında dolaşımdaki başlıca miRNA'lar...	32
<b>Şekil 2.10:</b> miRNA profillendirmede kullanılan başlıca qRT-PCR teknikleri.....	34
<b>Şekil 3.1:</b> miScript HiSpec tamponu ve oligo-dT primerleri kullanılarak olgun miRNA'ların özgül olarak cDNA'ya dönüşümü.....	43
<b>Şekil 3.2:</b> Thermal Cycler Cihazı.....	44
<b>Şekil 3.3:</b> Real-Time PCR amplifikasyon cihazı.....	47
<b>Şekil 3.4:</b> qRT-PCR amplifikasyonu sırasında floresan ışına eğrilerinin görünümü..	48
<b>Şekil 4.1:</b> $2^{-\Delta Ct}$ değerlerine göre olgun miRNA ekspresyonlarının çalışma gruplarında istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	53
<b>Şekil 4.2:</b> hsa-miR-128-3p'nin demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi.....	56
<b>Şekil 4.3:</b> hsa-miR-196a-5p'nin demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi.....	58

**Şekil 4.4:** hsa-miR-373-3p'nin demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi.....60

**Şekil 4.5:** hsa-miR-375'in demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi.....62



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1:</b> Koroner Arter Hastalığı Geleneksel Risk Faktörleri.....	7
<b>Tablo 2.2:</b> Koroner Arter Hastalığı Yeni Risk Faktörleri.....	8
<b>Tablo 2.3:</b> Koroner Arter Hastalığı gelişiminde rol oynadığı bildirilen genler.....	10
<b>Tablo 2.4:</b> Akut Koroner Sendrom patogeneğinde ve prognozunda bildirilen başlıca biyobelirteçler ve ilişkili oldukları temel mekanizmalar.....	14
<b>Tablo 2.5:</b> Başlıca RNA çeşitleri .....	17
<b>Tablo 2.6:</b> Hastalıklarda rol oynadığı bildirilen başlıca miRNA'lar.....	23
<b>Tablo 2.7:</b> miRNA profilendirme yöntemlerinin özellikleri ve karşılaştırılması....	33
<b>Tablo 3.1:</b> Projede Kullanılan Mevcut Makine-Teçhizat Listesi.....	37
<b>Tablo 3.2:</b> cDNA dönüşümü için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	44
<b>Tablo 3.3:</b> Hedef miRNA'lar ve ilişkili genler .....	46
<b>Tablo 3.4:</b> Olgun Hedef miRNA primer dizileri.....	46
<b>Tablo 3.5:</b> qRT-PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	47
<b>Tablo 3.6:</b> qRT-PCR Tepkime Koşulları.....	48
<b>Tablo 4.1:</b> Çalışma gruplarının klinik ve demografik özellikleri.....	51
<b>Tablo 4.2:</b> Çalışma grupları arasındaki miRNA ifade değişimlerinin p değerleri ile gösterimi.....	52
<b>Tablo 4.3:</b> Demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre miRNA ifade seviyelerinin karşılaştırılması.....	55

## ÖZET

### Adıyaman İlinde Akut Koroner Sendrom Olgularında miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Dr. Ömer Faruk KARAÇORLU  
Uzmanlık Tezi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ  
Mayıs 2017, 103 sayfa

Koroner Arter Hastalığı (KAH) zemininde gelişen Akut Koroner Sendrom (AKS) tüm dünyada ve ülkemizde ölüm ve iş göremezliğin başlıca nedenidir. KAH ve AKS etiyojisinde geleneksel olarak bilinen risk faktörleri ve yeni tanımlanmış diğer risk faktörlerinin dışında genetik temelli nedenler de önemli bir rol oynamaktadır. KAH gelişiminden sorumlu olan aterosklerozun patofizyolojisinde çevresel faktörler tarafından modifiye edilen ve genler tarafından kodlanan birçok enzim, reseptör, taşıyıcı, ligand, protein, belirteç ve bunların birbiri ile etkileşim içinde olduğu birçok yolak yer almaktadır. Gen ekspresyonunda ve regülasyonunda etkileri olduğu son yıllarda anlaşılan kısa kodlanmayan RNA'ların önemli bir üyesi olan Mikro RNA'ların dolaşımında bulunduğu tespit edilmesinden sonra özellikle de akut miyokart enfarktüsü ve kalp yetmezliğinde yeni belirteçler olarak araştırılmaya başlanmıştır. Çalışmamızda Adıyaman ilinde KAH ve AKS nedeniyle tanı ve tedavi amaçlı koroner anjiyografi yapılan olguların serum miRNA ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Bu amaçla koroner anjiyografisi normal olan (<50 darlık, non-obstrüktif) 45 olgu, koroner arterlerinde kritik darlık saptanıp ( $\geq$ 50 darlık, obstrüktif) KAH tanısı alan 45 olgu, koroner arterlerinde tam tıkanıklık saptanıp akut MI tanısı alan 45 olgu olmak üzere üç ayrı grupta toplam 135 olgu çalışmaya dahil edildi. Serum örneklerden RNA eldesi ve cDNA dönüşümünün ardından hsa-miR-128-3p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-373-3p ve hsa-miR-375 için kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) metoduyla miRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.  $2^{-\Delta Ct}$  formülü kullanılarak qRT-PCR sonuçları istatistiksel olarak analiz edildi. Gruplar arasındaki miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon testi, demografik özellikler ve klinik bulgulara göre miRNA ekspresyon ilişkisinin



istatistiksel olarak değerlendirilmesinde One-Way ANOVA testi kullanıldı. Çalışılan dört aday miRNA için de ( hsa-miR-128-3p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-373-3p ve hsa-miR-375 ) ekspresyon sonuçlarında farklı gruplar arasında (koroner arterlerinde tam darlık olan hasta grubu, koroner arterlerinde kritik darlık olan hasta grubu ve koroner arterlerinde darlık olmayan grup) istatistiksel olarak anlamlı miRNA ifade farklılıkları bulundu ( $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ). Ayrıca hsa-miR-373-3p ve hsa-miR-375 için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda 60 yaş uştnde olanlarda, erkek cinsiyette, hipertansiyonu olanlarda ve pozitif aile öyküsü bulunanlarda da farklı hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı miRNA ifade farklılıkları bulundu ( $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ). Ekspresyon farklılıkları tespit edilen bu miRNA'ların anjiyogeneziste belirgin rolleri olan genleri (*KLF4*, *HOXA5*, *SIRT1*, *PTPN1*) hedefledikleri deneysel olarak bilinmektedir. Hasta gruplarında farklı ekspresyon düzeylerini saptadığımız bu miRNA'ların KAH ve AKS gelişiminde rolleri olduğunu ve ayrıca bu hastalıklar için bir biyobelirteç adayı ve muhtemel tedavi hedefi olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışma sonuçlarının KAH ve AKS olgularının yönetiminde ve vasküler kaynaklı patolojileri değerlendirmede özellikle anjiyogenezis ile ilişkili mekanizmalara dikkat çekerek farklı bir bakış açısı ile katkı sunacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Anjiyogenezis, biyobelirteç, koroner arter hastalığı, miyokart enfarktüsü, miR-373-3p, qRT-PCR

## SUMMARY

### **Determination of miRNA Expression Levels of Acute Coronary Syndrome Cases at Adiyaman Province**

Ömer Faruk KARAÇORLU, M.D.  
Speciality Thesis, Medical Genetics Department  
Thesis Advisor: Prof. Haydar BAĞIŞ, DVM, PhD.  
May 2017, 103 pages

Acute Coronary Syndrome (ACS), developing on basis of Coronary Artery Disease (CAD), is the leading cause of mortality and morbidity at all the world and our country. Beside the known traditional risk factors and other newly defined risk factors, genetically based reasons also play important roles in the etiology of CAD and ACS. Lots of enzymes, receptors, transporters, ligands, proteins, markers coded by genes that modified by environmental factors and many complicated pathways related with each other and all those, are found at pathophysiology of atherosclerosis which is responsible for developing of CAD. After micro RNAs, an important member of short non-coding RNAs and recently understood that have effects on gene expression and regulation, found at circulation researchers started to work on new biomarkers especially on acute myocardial infarction and heart failure. Our study aimed to determine serum miRNA expression levels of cases who underwent diagnostic or therapeutic coronary angiography because of CAD and ACS at Adiyaman province. For this purpose, totally 135 patients were recruited and divided into 3 groups: 45 normal coronary arteries (coronary lesion <50%, non-obstructive), 45 obstructive CAD patients (coronary lesion  $\geq$ 50%, obstructive) and 45 acute myocardial infarction (complete stenosis) patients. After RNA isolation and cDNA conversion from serum samples, miRNA expression levels of hsa-miR-128-3p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-373-3p and hsa-miR-375 detected by the method of quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Statistical analysis of qRT-PCR expression results achieved by using the  $2^{-\Delta Ct}$  formula. Wilcoxon test performed for comparing of miRNA expression levels of groups and One-Way ANOVA test used for statistical analysis of miRNA expression levels' relation

according to demographic features and clinical findings. Expression differences were statistically significant for the four studied candidate miRNAs ( hsa-miR-128-3p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-373-3p and hsa-miR-375 ) between different groups (complete stenotic group, critically obstructive group and non-obstructive group ) ( $p<0.05$  and  $p<0.01$ ). Additionally, expression studies for hsa-miR-373-3p and hsa-miR-375 showed that patients over 60 ages, male, hypertensive and positive family history have statistically significant different miRNA expressions ( $p<0.05$  and  $p<0.01$ ). It is known that, those miRNAs that are expressed differently at our groups, target the genes which have important roles at angiogenesis (*KLF4*, *HOXA5*, *SIRT1*, *PTPNI*) and these targets are experimentally validated. We think that our results suggest those miRNAs, that are expressed differently at our patients, have roles at developing of CAD and ACS and also may become a candidate biomarker and putative therapeutic target for these diseases. It is thought that these study results will contribute to management of vascular pathologies, CAD and ACS especially by taking attention to mechanisms related with angiogenesis from a different perspective.

**Keywords:** Angiogenesis, biomarker, coronary artery disease, myocardial infarction, miR-373-3p, qRT-PCR

## 1. GİRİŞ

Mikro Ribo Nükleik Asit (miRNA) kısa kodlanmayan yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda tek iplikli RNA molekülüdür. Gerek mesajcı RNA (mRNA) yıkımı ile gerekse de mRNA'ya bağlanarak translasyonun başlamasını engellemek kaydı ile miRNA'lar gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bugüne kadar miRNA'ların büyüme, apoptozis, farklılaşma, anjiyogenezis gibi birçok temel olayda görev alarak vücut homeostazisinde ve hastalıkların etiopatogenezinde rolleri olduğu gösterilmiştir. Kanser, nörolojik hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar araştırma alanlarının başında gelmektedir. Tanıya yardımcı biomarker (biyobelirteç) olarak, prognoz tayini amaçlı veya tedaviye yönelik hedefler olarak miRNA'lar son yıllarda büyük önem kazanmaya başlamıştır.

Koroner Arter Hastalığı (KAH) zemininde gelişen Akut koroner sendrom (AKS) tüm dünyada mortalite ve morbiditenin en başta gelen nedenlerinden biridir. KAH ve AKS etiopatogenezinde birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Anjiyogenezisi etkileyen faktörlerin de KAH ve AKS gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Son yıllardaki araştırmalar miRNA'ların da hastalık sürecinde rol oynadığını göstermektedir. miRNA'ların dolaşımında bulunduğu tespit edilmesinden sonra özellikle de akut miyokart enfarktüsü (MI) ve kalp yetmezliğinde yeni belirteçler olarak araştırılmaya başlanmıştır. Şu ana kadar yapılan çalışmaların sonuçlarına göre miRNA'ların akut MI tanısında kardiyak troponin gibi geleneksel belirteçlere benzer şekilde ve akut MI sonrası prognoz belirlemede risk tahmini modellemelerinde değerli bir belirteç olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır. Bu alanda tanı, prognoz ve tedavi sürecinde miRNA'ların kullanımı ile ilgili araştırmalar devam etmektedir.

Tezimizde KAH ve AKS olgularında rolü olabileceği düşünülen aday miRNA'ların hasta gruplarında ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır ve bu konu ile ilgili çalışmalara başlanmıştır. Çalışmalarımızda anjiyogenezis sürecini etkileyen genlerle (*KLF4*, *HOXA5*, *SIRT1*, *PTPNI*) ilişkili olduğu konfirme edilmiş miRNA'ların (hsa-miR-128-3p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-375) hasta gruplarındaki ekspresyon düzeyleri ölçülerek karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda Adıyaman ilinde KAH ve AKS nedeniyle tanı ve

tedavi amaçlı anjiyografi yapılan hastalarda önceden belirlenen miRNA'ların düzeylerinin Gerçek zamanlı-Polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile ölçülmesi ve oluşturulan hasta gruplarında miRNA seviyelerinin istatistiksel olarak birbiri ile karşılaştırılması hedeflenmiştir. Daha önce literatürde kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkisi gösterilmiş miRNA'ları ve ilişkisi gösterilmemiş fakat benzer genler ile ilgili olduğu konfirme edilmiş aday miRNA'ları çalışmak ve bunların hasta gruplarımıza göre değişiminden yola çıkarak hastalık etiopatogenezine yönelik biyobelirteç ve tedavisine yönelik hedefler tanımlamak amaçlanmıştır. Bulunan sonuçların kardiyovasküler hastalıkların erken tanısında, takibinde ve/veya tedavisinde kullanılabilmesi böylece gelişmesi muhtemel komplikasyonların önlenmesine ve hastalığın mortalitesinin azalmasına katkıda bulunması amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. KORONER ARTER HASTALIĞI VE AKUT KORONER SENDROM

#### 2.1.1. Tanım ve Sınıflandırma

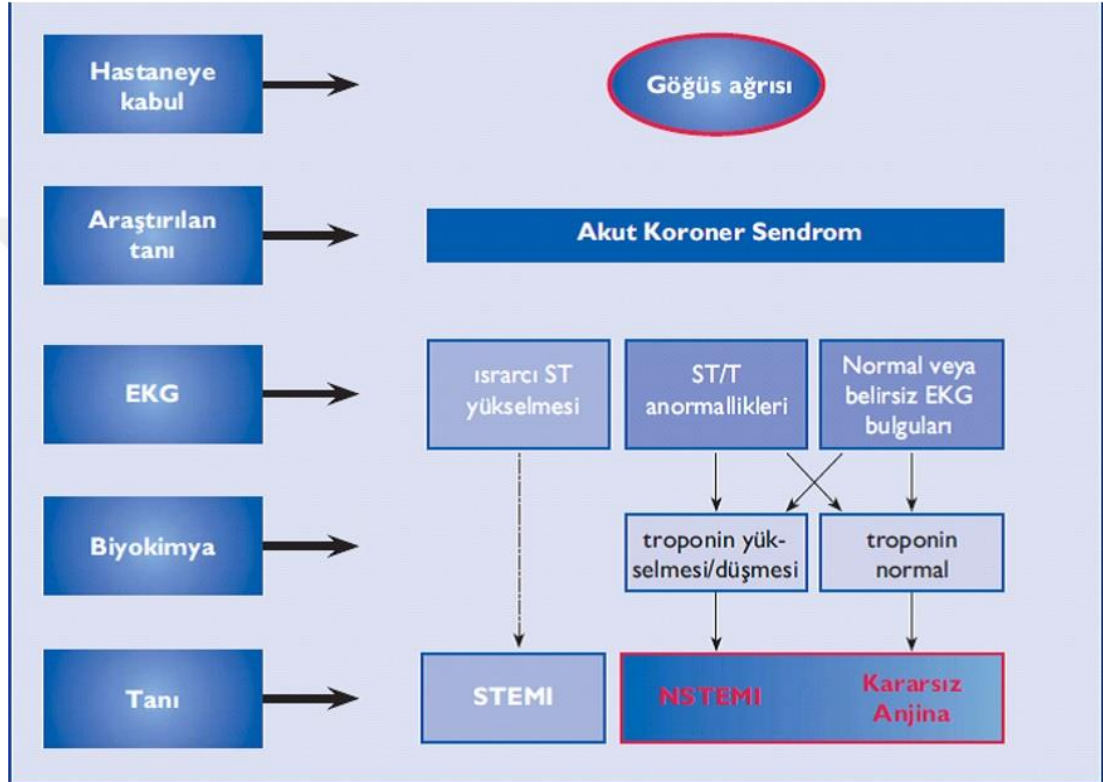
Koronere Arter Hastalığı (KAH), genellikle ateroskleroz süreci sonucunda oluşan bir ateroskleroz plak nedeniyle kalbin miyokart tabakasını besleyen koroner arterlerin lümenin daralmasıyla meydana gelen kronik, ilerleyici ve yıkıcı sonuçları olan bir hastalıktır.

Akut Koroner Sendrom (AKS), genellikle yırtılmış aterosklerotik bir koroner arter plağı nedeniyle veya akut trombozu tetikleyen bir vazokonstriksiyon nedeniyle koroner arter kan akımında ani ve kritik bir azalmaya neden olan, KAH sürecinin yaşamı tehdit edici sonucudur. AKS temel olarak ateroskleroz ve KAH zemininde gelişmesine rağmen; travma, arter diseksiyonu, tromboemboli, konjenital anomaliler, arterit veya kalp kateterizasyonu gibi farklı nedenlere bağlı olarak da gelişebilir (1).

KAH ve sonrasında gelişen AKS dünya genelinde ölüm ve iş göremezliğin başlıca nedenidir (1). Kaynaklarda, KAH için iskemik kalp hastalığı, koroner kalp hastalığı terimleri ve AKS için miyokart enfarktüsü (MI) terimleri de benzer anlamı olarak kullanılmakta ise de klinik alanlarda ve hasta yönetimlerinde farklı biçimlerde sınıflandırılabilir.

Klinik belirti ve bulgulara göre KAH, genellikle kronik olarak kontrol altına alınabilen kararlı göğüs ağrılarına neden olarak stabil anjina pectoris (AP) belirtilerine ve sonrasında iskemik kalp hastalığının şiddetinin artışı ile kontrol edilemeyen kararsız unstabil AP belirtilerine neden olmaktadır. AKS ise, KAH'nın akut klinik tablosu şeklinde ortaya çıkan ve akut miyokart iskemisi ile sonuçlanan; ST elevasyonlu miyokart enfarktüsü (STEMI), ST elevasyonsuz miyokart enfarktüsü (NSTEMI), unstabil AP ve ani kardiyak ölüm şeklinde klinik olarak sınıflandırılan durumları içermektedir. AKS'ler tipik göğüs ağrısı ile gelmiş hastalarda bakılan kardiyak belirteçler ve elektrokardiyografi (EKG) sonucuna göre sınıflandırılırlar. (Şekil 2.1) AKS'ler genellikle STEMI, NSTEMI, unstabil AP olarak üç gruba

sınıflandırılırlar. Bu ayırım, tedavi yaklaşımının belirlenmesinde, kısa ve uzun dönem prognoz tayininde de önemlidir. Unstabil AP, NSTEMI ve STEMI sendromları aralıksız bir bütündür ve patofizyolojisi heterojen ve dinamiktir. Klinik tipin oluşumu arter hasarının ciddiyetine, oluşan trombüsün büyüklük ve tipine, iskeminin büyüklüğü ve süresine ve daha önceki miyokart nekrozunun miktarına bağlı olarak değişir (2).



Şekil 2.1: Akut Koroner Sendrom Sınıflandırılması (2).

### 2.1.2. Epidemiyoloji

Kardiyovasküler sistem (KVS) hastalıkları tüm dünyada ve ülkemizde ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Dünya genelinde ve Türkiye’de birçok kuruluş ve araştırma merkezleri tarafından yapılan çalışmalarda KVS tutulumu nedeniyle oluşan hastalıkların gerek sağlık harcamaları gerekse klinik sonuçları yönünden en önemli hastalık grubu olduğu açıkça ortaya konulmuştur.

KVS hastalıkları içerisinde de iskemik kalp hastalıkları bir diğer adıyla KAH ve sonrasında gelişen AKS en önemli ve en büyük grubu oluşturmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre yılda 17,5 milyon ölüm ile 2012 yılında tüm ölüm sebepleri arasında KVS hastalıkları birinci gelmektedir. Bu ölümlerin 7,4 milyonunun iskemik kalp hastalıkları nedeniyle olduğu tahmin edilmektedir (3). Son dört dekad boyunca risk faktörlerinin ve tedavinin iyi yönetilmesine bağlı olarak gelişmiş ülkelerde KVS hastalıkları ölüm hızı azalma göstermektedir. Düşük gelirli ülkelerde ise risk faktörlerinden etkilenme daha az olmasına rağmen KVS hastalıkları nedeniyle ölüm hızı gelişmiş ülkelere göre daha yüksek seyretmektedir. KVS hastalıklar nedenli ölümlerin %80'i düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir (4).

Amerikan Kalp Cemiyeti (AHA) verilerine göre 2030 yılına kadar KAH prevalansının yaklaşık %18 artış göstereceği tahmin edilmektedir. 20 yaş ve üzerindeki Amerikan popülasyonda KAH sayısının yaklaşık 15,5 milyon ve prevalansın %6,2 olduğu belirtilmektedir. AKS prevalansının ise %2,8 olduğu tahmin edilmektedir. İnsidans çalışmalarına göre her 42 saniyede bir AKS gerçekleşmektedir. Yılda yaklaşık 660 bin yeni AKS ve 305 bin tekrarlayan olay görülmektedir. Ek olarak yılda yaklaşık 160 bin sessiz Akut MI olduğu kabul edilmektedir (5).

Avrupa Kardiyoloji Cemiyeti (ESC) verilerine göre de dünya genelinde KAH ölümünün tek başına en sık nedenidir. Her yıl yedi milyondan fazla kişi KAH nedeniyle ölmektedir ve bu, tüm ölümlerin %12,8'sini oluşturmaktadır. Avrupa'da her altı erkekten ve her yedi kadından birinin AKS nedeniyle öleceği bildirilmektedir (2).

Ülkemizde KAH ve AKS prevalansı için yapılan araştırmalardan en uzun süreli hasta takibi olanı Türk Kardiyoloji Derneğinin öncülüğünde yapılan Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri (TEKHARF) çalışmasının 2012 verilerinden yapılan hesaplama göre, ülkemizde yılda yaklaşık 420 bin koroner olay meydana gelmekte, bunların 120 bini önceden bilinen KAH hastalarında akut olayın tekrarı şeklinde, 180 bini ilk defa AKS ile gelen hastalarda, 120 bini ise sessiz olay ve yeni kronik KAH şeklinde gelişmektedir (6).



Türkiye İstatistik Kurumu'nun uluslararası hastalıkları sınıflandırma tanı kodlarına ICD-10 (International Classification of Diseases version 10) göre hazırladığı 2015 yılı TÜİK Ölüm Nedeni İstatistiklerinde Dolaşım Sistemi hastalıkları % 40,3 ile ölüm nedenleri arasında açık ara en üst sırada yer almıştır. İyi huylu ve kötü huylu tümörlere bağlı ölümler % 20,0 iken solunum sistemi hastalıklarına bağlı ölümler %11,1 olarak gerçekleşmiştir (7). Ölüm vakalarının 2013 yılında %39,6'sını, 2014 yılında %40'ını oluşturan dolaşım sistemi hastalıkları 2015 yılında ise %40,3'ünü oluşturarak ilk sırada yer almıştır. Dolaşım sistemi hastalıkları nedeniyle gerçekleşen ölümlerin 2015 yılında %40,5'i iskemik kalp hastalığından, %24,3'ü ise serebro-vasküler hastalıktan kaynaklanmıştır. İkamet edilen ile göre ölüm nedenleri incelendiğinde; dolaşım sistemi hastalıklarına bağlı ölümlerin oranının en yüksek olduğu ilk beş il; Denizli (%53,7), Karaman (%49,8), Bolu (%48,4), Yozgat (%47,5) ve Adıyaman (%46,8) olarak sıralanmıştır (7).

Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan Ulusal Hastalık Yüğü Çalışması 2003 çalışmasına göre iskemik kalp hastalıkları tüm ölümler dikkate alındığında %21,7'lik pay ile en sık ölüme neden olan hastalık olmuştur. KVS hastalıklarına bağlı mortalite yükü, erkeklerde %29, kadınlarda %31 ile birinci olmuştur. Toplam hastalık yükünün %19,3'ü KVS hastalıklarına bağlıdır. Ulusal Hastalık Yüğü 2013 sonuçlara göre ise iskemik kalp hastalığı yükünde %12,3 azalma görülmesine rağmen halen hastalık yükü sıralamasında en başta gelmektedir (8).

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından yapılan Türkiye Kronik Hastalıklar ve Risk Faktörleri Sıklığı Çalışması 2011 verilerine göre Türkiye'de erkeklerin %6,4'ünde; kadınların ise %9,8'inde öykü veya Rose anketine göre tanımlanan AP saptanmıştır. Akut MI öyküsü erkeklerde %2,3; kadınlarda %1,1'dir. Beyana dayalı doktor tarafından tanı konulmuş koroner kalp hastalığı sıklığı erkeklerde %3,8; kadınlarda %2,3'dür (9).

Kalp ve damar hastalıklarından ölümler gelişmiş batılı ülkelerde azalma eğilimi gösterirken gelişmekte olan ülkelerde artmaktadır. Ancak toplumların yaşlanması ve beklenen yaşam süresinde görülen uzama ile gelişmiş ülkelerde kalp ve damar hastalığı sayısı artmakta ve bunlara bağlı yük ise azalmamaktadır. KAH ve AKS önemini korumaya devam etmektedir.

### 2.1.3. Etiyoloji

KAH patofizyolojisinde altta yatan tek bir neden bulunmamakla beraber genetik yapının ve çevresel koşulların bu sürece birlikte katkı sağladığı açıktır. KAH ve AKS gelişiminde geçmişten günümüze birçok risk faktörü ve biyolojik mekanizma tanımlanmıştır. Geleneksel risk faktörleri, yeni çalışmalarda bildirilen risk faktörleri ve genetik temelli araştırmalar bir bütün olarak ele alınarak KAH etiopatogenezi değerlendirilmesi uygun olacaktır.

#### 2.1.3.1 Risk Faktörleri

DSÖ verilerine göre üç yüzden fazla risk faktörü bulunmaktadır. Tüm toplumlarda sık rastlanılan, tek başına bağımsız risk faktörü olan ve değiştirildiği takdirde KAH sıklığında azalma görülecek olan risk faktörleri başlıca risk faktörü olarak kabul edilmektedir (10).

KAH gelişiminde rol oynayan başlıca geleneksel risk faktörleri ve ikincil geleneksel risk faktörleri aşağıdaki tabloda olduğu şekilde sınıflandırılmaktadır.

**Tablo 2.1:** Koroner Arter Hastalığı Geleneksel Risk Faktörleri

Geleneksel Risk Faktörleri		
Değiştirilemeyen Başlıca Risk Faktörleri	Değiştirilebilen Başlıca Risk Faktörleri	İkincil Risk Faktörleri
Aile öyküsü	Artmış vücut kitle indeksi	Alkol ve madde kullanımı
Cinsiyet	Tütün kullanımı	Düşük sosyoekonomik düzey
Etnik yapı	Yetersiz fiziksel aktivite	Oral kontraseptifler / hormon replasman tedavisi
Yaş	Yüksek açlık kan şekeri	Psikiyatrik hastalık varlığı
	Yüksek kan basıncı	Sol ventrikül hipertrofisi
	Yüksek lipid profili (LDL kolesterol ve trigliserid yüksekliği, HDL kolesterol düşüklüğü)	Yüksek Lipoprotein (a) düzeyi
	Yüksek yağlı diyet, düşük sebze meyve tüketimi	Yüksek stres ve A tipi kişilik

Risk faktörlerinin tanımlanması ve bu faktörlerin giderilmesi, asemptomatik kişilerde KAH gelişiminin (birincil koruma) ve KAH olan kişilerde de tekrarlayan olayların önlenmesi (ikincil koruma) için gereklidir. Hastalık Yüğü istatistiklerinde önemli bir payı olan kalp ve damar hastalıkları açısından olumlu olan husus büyük ölçüde “önlenebilir” olmalarıdır. DSÖ; kan basıncı, obezite, kolesterol ve sigara içiminin kontrolü ile kalp ve damar hastalığı görülme sıklığının yarıya indirilebileceğini bildirmektedir. Son 20 yılda kalp ve damar hastalıklarından kaynaklanan mortalite yüksek gelir düzeyindeki ülkelerde azalmaktadır. İngiltere’de 1981’den 2000 yılına kadar koroner kalp hastalığına bağlı mortalitede belirgin bir düşüş olmuştur. Bu düşüşün yaklaşık %42’si tedaviyle ilişkilidir (%11’i ikincil önleme, %13 kalp yetmezliği tedavisi, %8 akut miyokart enfarktüsünde başlangıç tedavisi, %3 hipertansiyon tedavisi). Geri kalan yaklaşık %58’lik düşüş tüm nüfusu kapsayan risk faktörlerini azaltmaya yönelik çalışmalara bağlıdır (11).

KAH gelişiminde geleneksel risk faktörlerinin yanı sıra son dönemde birçok yeni faktörün de hastalık etiolojisinde rol oynadığı bildirilmektedir. KAH gelişiminde bildirilen yeni risk faktörlerinden bazıları aşağıdaki tabloda sıralanmıştır:

**Tablo 2.2:** Koroner Arter Hastalığı Yeni Risk Faktörleri

Yeni Risk Faktörleri
BNP (Beyin Natriüretik Peptit) ve ProBNP Yüksekliği
Enfeksiyon varlığı
Koagülasyon bozuklukları, protrombotik faktörler
Oksidatif stres
Renal yetersizlik
Yüksek İnflamatuvar belirteç (CRP) düzeyleri
Yüksek Homosistein düzeyi

### 2.1.3.2 Genetik nedenler

Aile öyküsü, KAH gelişiminde değiştirilemeyen bağımsız risk faktörlerinden biridir. Ailesinde KAH ve AKS bulunanlarda 1,5-2 kat artmış ampirik risk bulunduğu bildirilmektedir. Çokuluslu INTERHEART vaka-kontrol çalışmasında 12149 hasta ve 14467 kontrol izlenerek ebeveynlerde MI öyküsü ile çocuklarında MI gelişmesi arasındaki ilişki incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre; ebeveynlerinde öykü bulunmayan kişilerde risk 1 kabul edildiği takdirde, tek ebeveynde 50 yaş sonrasında öykü var ise risk 1,67'ye yükselmektedir. Yine tek ebeveynde 50 yaş öncesinde öykü var ise risk 2,36'ya yükselmektedir. Her iki ebeveynde 50 yaş sonrasında öykü var ise risk 2,90 iken, her iki ebeveynde 50 yaş öncesinde öykü var ise risk 6,56'ya yükselmektedir. Bir ebeveynde 50 yaş öncesinde diğerinde 50 yaş sonrasında öykü olması durumunda ise risk 3,26 olmaktadır. Her iki ebeveyninde genç yaşta AKS görülen kişilerde göreceli risk oranları daha fazla artmaktadır (12).

Tek gen hastalıklarından olan Ailesel Hiperkolesterolemi (AH), LDL yüksekliği ile seyreden, genç yaşta KAH ve AKS gelişimine yol açan genetik temelli bir hastalıktır. AH hastalarında ayrıca cilt ve tendonlarda ksantomlar, arterlerde aterosklerotik plaklar ve arkus kornea adı verilen kornea periferinde kolesterol depolanmaları da görülmektedir. Ailesel Tip 2 Hiperliporoteini adı da verilen AH hastalığına yol açan genetik defektler en çok LDL reseptör geninde (*LDLR*) bulunmaktadır. *LDLR* dışında, *APOB* ve *PCSK9* genlerindeki mutasyonlar da AH tablosuna yol açmaktadır. Hastaların %20-40 kadarında ise neden bilinmemektedir. Otozomal dominant geçiş özelliğine sahip AH hastalarında *LDLR* gen dozajı da önemlidir. Homozigot mutantlarda daha erken ve şiddetli KAH görülürken sıklığı milyonda birdir ve genellikle 30 yaşından önce AKS nedeniyle ölüm gerçekleşmektedir. Heterozigotlarda ise, plazma kolesterol düzeyi kontrolün iki katı olmakla birlikte toplumda sıklığı 500'de 1'dir. Genel popülasyonda kolesterolü yüksek olanlarda 20'de 1 AH olma ihtimali bulunmaktadır, LDL reseptör bozukluğu olan MI hastalarına genetik tanı durumu araştırılmalıdır (13).

Poligenik bir KVS hastalığı olan KAH temelde ateroskleroz gelişimi sonucu oluşmaktadır. KAH gelişiminden sorumlu olan aterosklerozun patofizyolojisinde

çevresel faktörler tarafından modifiye edilen ve genler tarafından kodlanan birçok enzim, reseptör, taşıyıcı, ligand, protein, belirteç ve bunların birbiri ile etkileşim içinde olduğu birçok yolak yer almaktadır. KAH; oksidatif stres, folat-homosistein metabolizması, tromboz ve fibrinolitik sistemleri üzerinde etkili olan genlerin diğer risk faktörleri ile etkileşimi ile lipid bozuklukları, endotelial disfonksiyon, arteriyel inflamasyon, kan basıncı düzensizlikleri, koagülasyon bozuklukları ve tromboz sonucunda aterosklerozun gelişimi ile oluşmaktadır (14). Tüm bu biyolojik süreçlerle ilgili genom boyunca yayılmış onlarca gen ve bu genlerin değişiklikleri KAH etiolojisinde araştırılmakta ve yeni yeni genetik yatkınlık nedenleri bulunmaktadır. KAH gelişiminde rol oynadığı bildirilen başlıca genler aşağıdaki tabloda sıralanmıştır:

**Tablo 2.3:** Koroner Arter Hastalığı gelişiminde rol oynadığı bildirilen genler

Tek gen Hastalığı (AH) ile		Poligenik yolaklar ile (14)	
Gen	Lokus	Gen (15)	Lokus (16)
<i>LDLR</i>	19p13.2	9p21 gen bölgesi (17)	Genom çalışması
<i>APOB</i>	2p24.1	<i>MTHFR</i>	1p36.22
<i>PCSK9</i>	1p32.3	<i>CBS</i>	21q22.3
<i>LDLRAP1</i>	1p36.11	<i>ACE, AGT, AGTRI</i>	17q23.3, 1q42.2, 3q24
		<i>F2, F5, F7</i>	11p11.2, 1q24.2, 13q34,
		<i>F13A, F13B</i>	6p25.1, 1q31.3
		<i>APOE</i>	19q13.32
		<i>CETP</i>	16q13
		<i>LPL</i>	8p21.3
		<i>PONI</i>	7q21.3
		<i>SERPINE1</i>	7q22.1
		<i>FGB</i>	4q31.3
		<i>ITGA2B, ITGB3</i>	17q21.31, 17q21.32
		<i>SELE</i>	1q24.2
		<i>ICAM1</i>	19p13.2
		<i>PROCR</i>	20q11.22
		<i>ADAMTS7</i>	15q25.1
		<i>MMP3, MMP9</i>	11q22.2, 20q13.12
		<i>NOS3</i>	7q36.1

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunda stabil değişimler olarak son yıllarda yeniden tanımlanmıştır. Epigenetik faktörlerin diyet, çevre ve yaşam tarzı gibi dış etkenler ile KVS hastalıklarına katkıda bulunduğu yapılan araştırmalar sonucunda açıklanmıştır. Vasküler sistemin de epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlendiği belirtilmektedir. Çalışmalar epigenetik belirteçlerin damar gelişimi, endotel ve düz kas hücre farklılaşması işlevlerinde de önemli rolleri olduğunu göstermiştir. En iyi bilinen epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve mikro RNA'lardır (14).

Mikro RNA'lar vasküler hücre farklılaşması, çoğalması, yaşamı, metabolizması ve gelişmesi gibi vasküler işlevlerin çok geniş bir aralıkta post-transkripsiyonel düzenleyicileri olarak görev almaktadır (18). Mikro RNA'lar aracılığı ile vasküler genlerin mutasyonlarının ve/veya hatalı ifadelerinin düzenlenmesi KVS hastalıklarının mekanizmasında etkili olan vasküler sinyal yollarında önemli sonuçlar oluşturmaktadır.

Endotel hücrelerinin işlev bozukluğu veya kaybı bozulmuş anjiyogenezisin karakterisitik bir özelliği olarak kabul edilir ve iskemik kalp hastalığının, vasküler hastalıkların, inflamasyonun ve aterosklerozisin gelişmesine öncülük eder. 'AngiomiRNA'lar adı verilen bir grup mikro RNA anjiyogenik işlemlerin ve yanıtların düzenlenmesinde rol alırlar. Mir-126, vasküler bütünlüğü sağlayan ve endotel hücrelerinde rol alarak anjiyogenezisin ana düzenleyicisi olarak kabul edilen bir 'AngiomiRNA'dır (19).

KAH ve AKS gelişiminde rol oynayan tüm bu genetik nedenlerin tespit edilmesi hem hastalığın patogenezinin aydınlatılmasına hem de risk faktörleri ve yaşam tarzı değişiklikleri ile önleyici tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Hastalıkların oluşumunda yer alan yolların patolojik süreçteki rollerinin tespiti de bu yollar üzerinden ilaç tedavisi geliştirilebilmesine olanak sunacaktır.

#### **2.1.4. Tanı**

KAH'nın akut alevlenmesi nedeniyle veya daha önceden herhangi bir şekilde böyle bir durumu bilinmeyip tipik göğüs ağrısı nedeniyle başvuran hastalara AKS

ihtimali göz önünde bulundurularak hızlı bir şekilde tanı konulması, hastanın durumuna göre yapılması gereken özellikli tedaviye erken başlanması ve erken dönemde risk sınıflandırmasının yapılması çok büyük önem taşımaktadır. Akut MI sonrası görülen çeşitli komplikasyonların öngörülmesi ve önlenmesi açısından da bu durumların değerlendirilmesi oldukça kritiktir.

Miyokart enfarktüsü, iskemiye düşündürecek belirti ve bulgular ile birlikte EKG bulguları, miyokart nekrozunun biyokimyasal belirteçlerinin (biyobelirteçlerin) yükselmesi ve görüntülemeyi kapsayan klinik özellikleri ile tanımlanabilir veya patolojik olarak tanımlanabilir. Avrupa Kardiyoloji Cemiyeti (ESC) tarafından hazırlanan 'Üçüncü Evrensel Miyokart Enfarktüsü Tanımı' bildirisinde günümüzde miyokart enfarktüsünün evrensel tanımı aşağıdaki gibi belirtilmektedir (1):

Kardiyak biyobelirteçlerde (tercihen troponin), en az bir değer üst referans sınırının 99. persentilini aşacak şekilde yükselme ve/veya düşüş saptanması ile birlikte aşağıdakilerden en az birinin bulunması:

- İskemi belirtileri;
- Yeni veya tahminen yeni anlamlı ST-T değişiklikleri veya yeni sol dal bloğu;
- EKG'de patolojik Q dalgalarının gelişmesi;
- Yeni oluşmuş canlı miyokart dokusu kaybının görüntüleme kanıtı veya yeni duvar hareket bozukluğu;
- Anjiyografi ya da otopsi ile intrakoroner trombusun tespiti

KAH tanısında invaziv koroner anjiyografi koroner anatominin görüntülenmesinde kullanılan altın standart yöntemdir. Tanıda, lezyonların özelliklerini belirlemede ve tedavi yöntemini belirlemede temel basamaktır. Koroner arteriografi koroner arterleri ve buradaki darlıkların yerini, ciddiyetini ve şeklini anatomik olarak belirlemenin yanı sıra, distal damarların özelliklerini ve koroner akım indeksini, kolleteral damarları ve fonksiyonel önemini göstermesi açısından

önemlidir. Koroner anjiyografi, stenotik lezyonların distali ve kollateral dolaşımı cerrahi revaskülarizasyon için önemli bilgiler vermektedir.

#### 2.1.4.1 Biyobelirteçler

Geçmişte, Akut MI olarak belirlenmiş klinik sendrom için DSÖ hastalık prevalansı çalışmalarında belirtiler, EKG anormallikleri ve kardiyak enzimler ile hastalık tanımlanmıştır. Ancak, daha duyarlı ve miyokart dokusuna özgül kardiyak biyobelirteçlerin ve daha duyarlı görüntüleme tekniklerinin gelişmesi, günümüzde çok küçük miktardaki miyokart hasarının veya nekrozunun tespit edilebilmesini sağlamaktadır (1).

Miyokart hasarını değerlendirmek için birçok biyobelirteç bildirilmiştir. Ancak bugün en iyi bilinen ve en çok kullanılan iki biyobelirteç CK-MB ve kardiyak troponinlerdir (20). Kardiyak troponinler, 2000 yılında, Akut MI tanısında üstün bir belirteç olarak CK-MB'nin yerini almıştır (21).

Günümüzde tercih edilen biyobelirteç miyokart dokusuna olan yüksek özgüllüğü ve bir o kadar yüksek klinik duyarlılığı nedeniyle kardiyak troponinler (Troponin I veya Troponin T)'dir. Ölçümlerde bir artma ve/veya azalmanın tespiti Akut MI tanısının temelidir. Yükselmiş kardiyak troponinkonsantrasyonu normal referans toplumun 99. persentilini üst referans sınırını aşan değer olarak tanımlanır. Kardiyak ve iskelet kası troponin I ve T'leri değişik genler tarafından kodlanırlar (kardiyak troponinler *TNNT2* ve *TNNI3* genleri tarafından kodlanırlar). İskelet kası ile karşılaştırıldığında, kardiyak troponin I 30 amino asit daha uzundur, kardiyak troponin T'nin ise kendine has 11 amino asitlik dizisi vardır. Bu özellikler kardiyak özgüllüğü sağlar. Kardiyak Troponin I'nın normal, rejenerasyon gösteren veya hasta iskelet kasından eksprese olmadığı gösterilmiştir (22).

Çeşitli klinik durumlarda da kardiyak hasar oluşması nedeniyle kardiyak troponin seviyelerinde değişiklikler olabilmektedir. Böbrek yetersizliği, kalp yetersizliği, taşiaritmi veya bradiaritmiler, kardiyak veya kalp dışı girişimler, kardiyak troponin yükselmesi ile kendini gösteren hücre ölümü ile seyreden miyokart hasarı ile ilişkili olabilir. Ancak, bu durumlar aynı zamanda kardiyak troponinlerde



artma ve/veya azalma ile birlikte akut miyokart iskemisinin klinik kanıtı olması durumunda miyokart enfarktüsü ile de ilişkili olabilir (1).

AKS durumunda, öncesinde ve sonrasında tanı, risk sınıflandırması ve prognoz tahmini amacıyla kardiyak enzimler, myoglobinler ve troponinler dışında da birçok biyobelirteç araştırılmaktadır. Bu biyobelirteçler aşağıdaki tabloda sıralanmıştır:

**Tablo 2.4:** Akut Koroner Sendrom patogenezinde ve prognozunda bildirilen başlıca biyobelirteçler ve ilişkili oldukları temel mekanizmalar (20)

<b>Nötrofilik Aktivasyon</b>	Miyeloperoksidaz	<b>AVP Aks Aktivasyonu</b>	Kopeptin
	Matriks metalloproteinaz	<b>Nekroz</b>	Kreatin Kinaz, AST, LDH-1, myoglobin
<b>Plak İnstabilitesi ve İnflamasyon</b>	HsCRP		Troponin I, Troponin T HsTnT
	PaPPA MPO	<b>Pre-Nekroz</b>	H-FABP
<b>Nörohormonal yolak aktivasyonu</b>	Adrenomedullin	<b>Biyomekanik Stres Mekanizmalar</b>	BNP / NTproBNP
<b>Endotel Aktivasyonu</b>	Endotelin		ANP
<b>Antioksidan Mekanizmalar</b>	Bilirubin (23)		GDF-15 ST2
		<b>Ekstraselüler</b>	MMP9
		<b>Matriks Bütünlüğü</b>	MMP2 TIMP

Mikro RNA'ların dolaşımında bulunduğu tespit edilmesinden sonra özellikle de Akut MI ve kalp yetmezliğinde yeni belirteçler olarak araştırılmaya başlanmıştır. Şu ana kadar yapılan çalışmaların sonuçlarına göre mikro RNA'ların Akut MI tanısında kardiyak troponin gibi geleneksel belirteçlere benzer şekilde ve Akut MI sonrası prognoz belirlemede risk tahmini modellemelerinde değerli bir belirteç olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır. Bu alanda tanı, prognoz ve tedavi sürecinde mikro RNA'ların kullanımı ile ilgili araştırmalar devam etmektedir (24).

## 2.2. MİKRO RNA

### 2.2.1. Tanım, tarihçe, sınıflandırma ve terminoloji

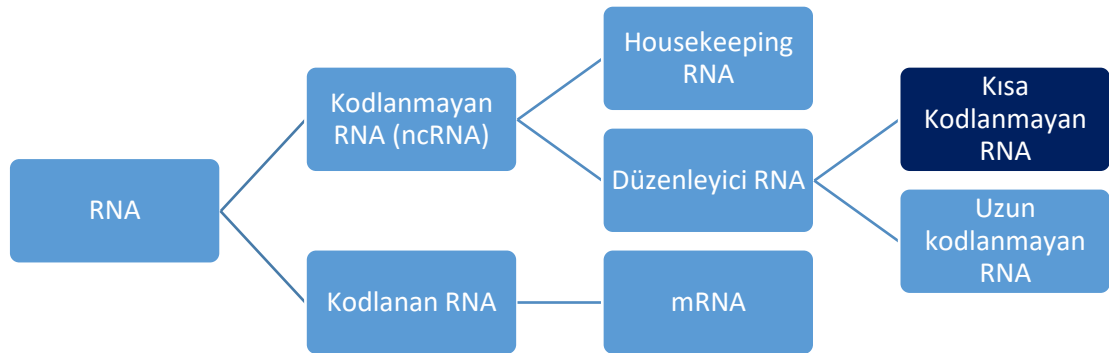
Mikro RNA, ortalama 22 (15nt-27nt) nükleotid içeren kısa kodlanmayan tek iplikli RNA molekülüdür. Mikro RNA'lar, kendilerine özgü genlerden veya intron bölgelerinden kodlanan endojen saç tokası (hairpin) şeklinde transkriptlerden türeyip proteine dönüşmeyen, posttranskripsiyonel düzenleyici rolleri sayesinde gen ifadesi üzerinde etkileri bulunan, küçük RNA dizilerinin geniş ve önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Mikro RNA'lar gen fonksiyonunu mesajcı RNA (mRNA)'nın yıkılması, translasyonun durdurulması veya mikro RNA aracılı mRNA bozulması ile posttranskripsiyonel seviyede düzenlerler (25).

Mikro RNA'ların keşfi ve sonrasında tıp uygulamalarında kullanımı yakın zamanda ortaya çıkmış güncel bir araştırma alanıdır. İlk defa 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından Victor Ambros laboratuvarında nematod grubundan bir solucan olan *Caenorhabditis elegans* türünde yapılan genetik çalışmalar sırasında *lin-4* adlı bir genin küçük bir RNA transkribe ettiğifakat hiçbir proteini kodlamadığı keşfedilmiştir (26). Nematodlara özgü bir RNA olduğu düşünülen kodlama yapmayan bu küçük RNA'nın keşfinden yedi yıl sonra bu canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen başka bir mikro RNA ise Reinhart ve arkadaşları tarafından bulunmuş ve *let-7* olarak adlandırılmıştır (27). Zamanla bu küçük RNA'ların sadece nematodlarda değil, aynı zamanda virüslerde, bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda da bulunduğu ve gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (28). Mikro RNA (miRNA) terimi 2001 yılından itibaren literatürde kullanılmaya başlanmıştır (29). Ayrıca kodlanmayan RNA'ların gen ekspresyonuna olan etkileri hakkında çalışma yapan bilim insanlarından Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello 1998 yılında yayınladıkları 'RNA interferans-çift iplikli RNA aracılığıyla gen susturulması' başlıklı çalışmaları genom düzenlenmesindeki önemi nedeniyle yeni bir fenomen olarak kabul edilmiş ve buluşlarından dolayı 2006 yılında Tıp alanındaki Nobel ödülünü kazanmışlardır (30, 31). Küçük RNA'lar ve RNA interferans fenomeni, Science dergisi tarafından '2002 yılının en önemli bilimsel gelişmesi' seçilmiştir (32). 2000'li yıllara kadar önemi tam olarak anlaşılabilen miRNA'larinsanlarda ise ilk kez 2002 yılında Calin ve arkadaşları tarafından miR-15

ve miR-16 tiplerinin B-hücreli kronik lenfositik lösemi ile ilişkisinin olduğu gösterilerek hastalıkların etiyopatogenezinde etkili olduğu bildirilmiştir (33).

Epigenetik düzenleyici mekanizmalar birbirleriyle etkileşim içerisinde gen ekspresyonunu kontrol ederlerken, bunlardan kovalent modifikasyonlar olan DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının aksine, kodlamayan RNA'lar tarafından yapılan düzenlenmeler ve modulasyonlar en önemli kovalent olmayan epigenetik modifikasyonlardır (34).

İnsan genomunun yalnızca %1-2'si protein kodlamaktadır. Geri kalanına önceden 'junk' DNA adı verilmekte iken bunların da büyük çoğunluğunun transkribe olduğu ve görevleri olduğu anlaşılmıştır (35). DNA, RNA'ya %90 oranında transkribe olduktan sonra çok az bir kısmı translasyona devam etmektedir. Proteine çevrilmeyen transkripte ise 'kodlanmayan RNA' (ncRNA) denilmektedir. Çok sayıda tipi bulunan ncRNA'lar yaşam için gerekli (housekeeping) ncRNA'lar ve düzenleyici ncRNA'lar olmak üzere başlıca iki sınıfa ayrılmaktadır. Housekeeping RNA'lar canlıların bütün dokularında bulunarak çok sayıda işlevleri yerine getirirken, gen ifadesinin düzenlenmesinde işlevleri olan düzenleyici ncRNA'lar ise nükleotid (nt) sayılarına göre uzun ncRNA ( >200nt ) ve kısa ncRNA ( <200nt ) olarak iki alt sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.2) (36).



**Şekil 2.2:** RNA'ların sınıflandırılmasında Mikro RNA'ların yeri

RNA molekülü proteine dönüştürülen ve proteine dönüştürülmeyenler olmak üzere iki sınıfa ayrıldığında; proteine dönüştürülenler mRNA, proteine dönüştürülmeyenler ise tRNA, rRNA, küçük RNA ve diğer kodlama yapmayan RNA'lar olarak sınıflandırılmaktadır. Birçok çeşiti bulunan küçük RNA'ların

başlıcaları; siRNA (küçük sessizleştirici RNA), snoRNA (küçük nükleolar RNA), snRNA (küçük nükleer RNA) ve miRNA (mikro RNA)'dır (37). miRNA'ların insan genomunun yaklaşık %3'ünü teşkil ettiği tahmin edilmektedir (38).

**Tablo 2.5:** Başlıca RNA çeşitleri

RNA	İşlevi
mRNA (Mesajcı RNA)	Protein kodlanması
rRNA (Ribozomal RNA)	Protein sentezi
tRNA (Taşıyıcı RNA)	Protein sentezi
tmRNA (Taşıyıcı-mesajcı RNA)	Takılıp kalmış ribozomların kurtulması
aRNA (Ters anlamlı RNA)	Gen düzenlenmesi
siRNA (Küçük sessizleştirici RNA)	Gen düzenlenmesi
<b>miRNA (Mikro RNA)</b>	Gen düzenlenmesi
tasiRNA (Trans-etken RNA)	Gen düzenlenmesi
piRNA (Piwi-etkileşimli RNA)	Gen düzenlenmesi
snRNA (Küçük nükleer RNA)	Splice düzenlenmesi, transkripsiyon kontrolü
snoRNA (Küçük nükleolar RNA)	RNA'nın çekirdekte modifikasyonu
lncRNA (Uzun kodlama yapmayan RNA)	X inaktivasyonu, imprinting, telomer regülasyonu vd.
lincRNA (Uzun intergenik kodlama yapmayan RNA)	DNA kıvrılması, kromatin kompleksleri oluşumu
circRNA (sirküler RNA)	miRNA'ların baskılanması

Şu ana kadar insanda keşfedilmiş olan 2600'den fazla miRNA ve 1881 farklı olgun miRNA mevcuttur. Bu miRNA'lar 'mirBase' (<http://www.mirbase.org>) adresinde listelenmektedir (39). 'TargetScan' (<http://www.targetscan.org>) ve 'miRanda' (<http://www.microRNA.org>) gibi veri tabanlarında hangi mRNA'nın hangi miRNA ile hedeflenebileceğine dair tahminler yapılabilmektedir. Deneysel olarak kanıtlanmış hedefler de 'TarBase' ve 'miRTarBase' elektronik veritabanlarında listelenmektedir (40, 41). Bunların dışında PicTar, RNA22, PITA, DIANA-microT, mirDB gibi miRNA-Hedef mRNA-Hedef gen veritabanları bulunmaktadır.

miRNA adlandırmasında geçmişte farklılıklar olsa da günümüzde belli bir sıra izlenmektedir. Örneğin; hsa-miR-196a-5p için açıklayacak olursak, ilk üç harf

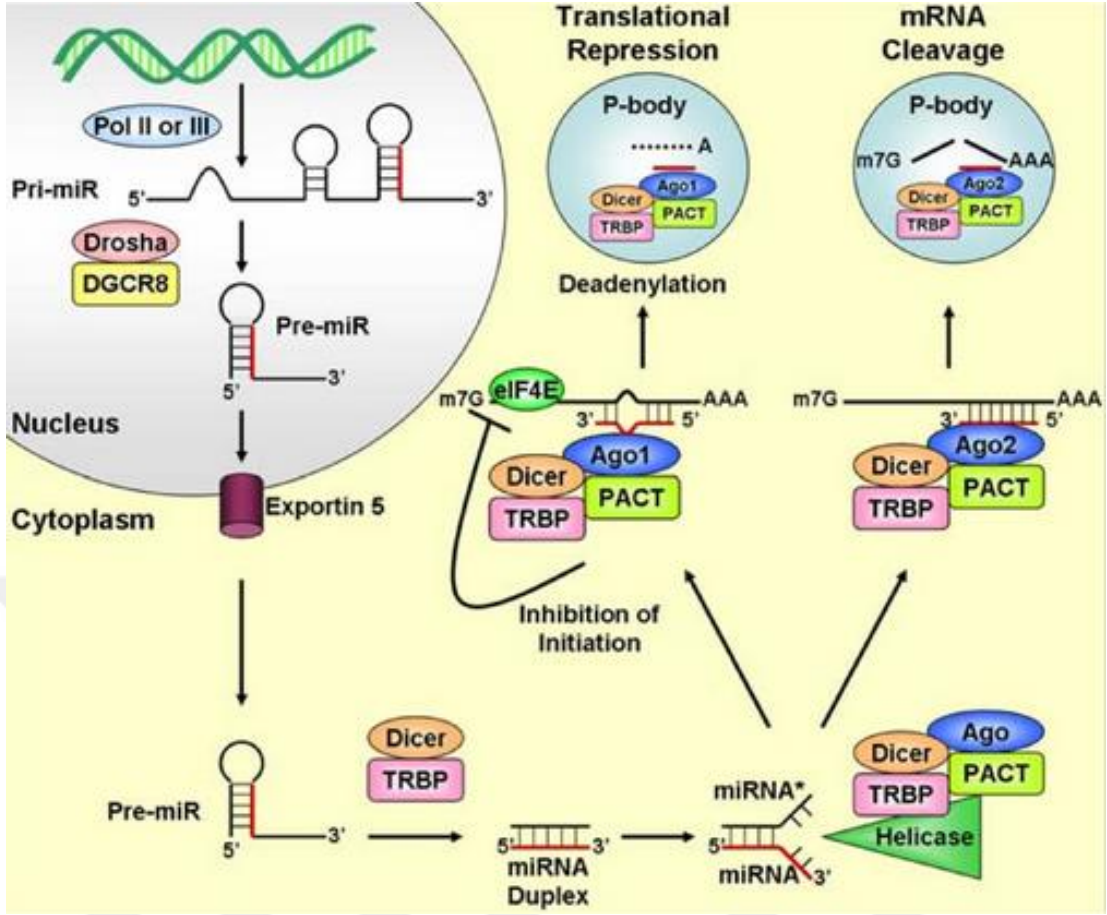
türü ifade eder (hsa:homosapiens, mmu:fareler, rno:ratlar için). Olgun miRNA için 'miR' kısaltması eklenir. Daha sonra ilk keşfedildiğinde özel bir sayı ile belirtilen miRNA adı kodlanır. Aynı tür için benzer diziyeye sahip miRNA'lar için a, b,c gibi harfler numaranın ardına eklenir. Numaranın aynı olması miRNA'ların aynı hedefi olduğu anlamına gelmemektedir. Olgun miRNA'nın prekürsörün 3p ya da 5p kolundan kaynaklanmasına göre de -3p veya -5p eklenir. Let-7 ailesi bu adlandırmaya istisnadır. miRNA kodlayan genler, primer transkriptler ve prekürsörler ise italik olarak belirtilir ve 'mir' ön ekini alırlar (24).

### 2.2.2. Mikro RNA Oluşum ve İşlev Mekanizmaları

Memelilerin transkriptinin %60'ından fazlasının miRNA'ların kontrolü altında olduğu tahmin edilmektedir (42). miRNA'ların ~%40'ı protein kodlayan genlerin intronlarından kodlanırken geriye kalanların genleri ise genom üzerindeki intergenik bölgelerde (%50) veya RNA kodlayan genlerde (%10) yer almaktadırlar (43). İntergenik miRNA'lar kendi genlerinin promoterlarından transkribe olurlarken, intron miRNA'ları ise lokalize oldukları genlerin promoterlarından transkribe olurlar. Pekçok miRNA geni, genomik kümeler şeklinde bulunup tek bir polisistronik transkript oluşturmaktadırlar (34).

Olgun miRNA (matür miRNA), fonksiyonel olan miRNA'dır. Olgun miRNA'nın oluşumu bir dizi transkript, transport ve enzimatik reaksiyonlarla meydana gelmektedir (Şekil 2.3).

Mikro RNA genleri RNA Polimeraz II ile yaklaşık 2 kb uzunluğundaki primer miRNA adı verilen, bir başlığı ve poli-A kuyruğu olan moleküllere (pri-miRNA) transkribe edilirler. Çekirdekte bunlar bir Rnase III enzimi olan Drosha ve bir RNA-bağlanma proteini olan DGCR8 yardımı ile prekürsör miRNA (pre-miRNA) lara çevrilirler. Pre-miRNA'lar yaklaşık 60-100 nükleotid uzunluğunda ve saç tokası (hairpin) şeklindedir. Aynı zamanda mirtron adı verilen alternatif bir yolak ile de intronların direkt splicing ile işlenmesi üzerinden de pre-miRNA'lar oluşabilmektedir.

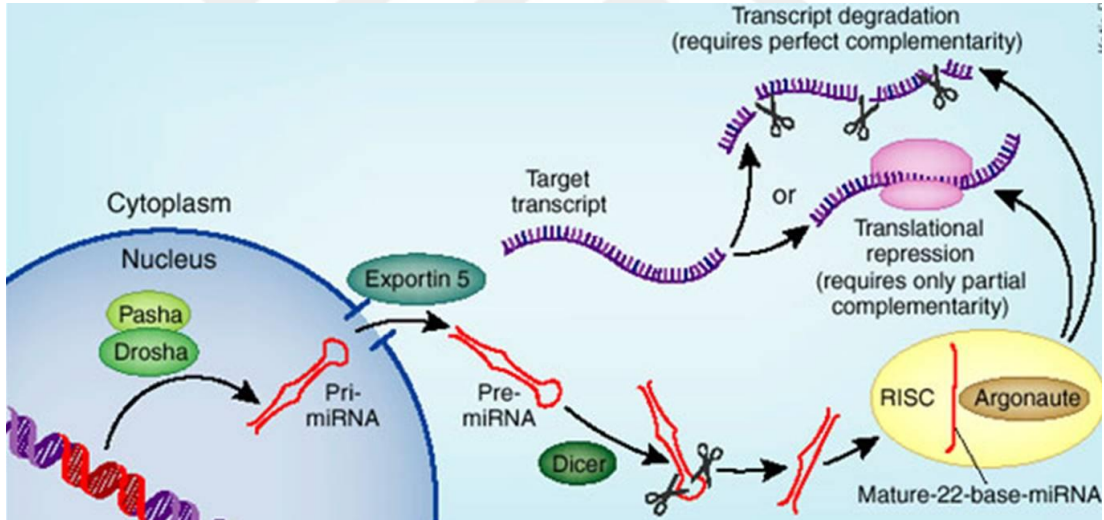


Şekil 2.3: Mikro RNA Oluşumu (44)

Hem pre-miRNA'lar hem de mirtron'lar Ran-GTP bağımlı transpoter olan Exportin 5 ile aktif olarak sitoplazmaya taşınırlar. Sitoplazmada bir diğer Rnase III enzimi olan Dicer enzimi ile TRBP ve PACT'den oluşan kompleks aracılığıyla pre-miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki bir fonksiyonel miRNA kılavuz ipliği ve bir yolcu ipliğinden oluşan kararsız çift iplikli miRNA duplekslerine bölünürler. Sonrasında dupleksler helikaz enzimi tarafından ayrılır, yolcu iplik kaybolur, kılavuz iplik ise Argonate proteinleri ile birlikte RNA-indüklenmiş susturma kompleksine (RISC) girer (45).

Olgun miRNA RISC içine girdikten sonra hedeflenen spesifik haberci mRNA'nın 3' UTR bölgesine tamamlayıcı dizisi ile bağlanır. Bağlandıktan sonra translasyon inhibisyonu ve/veya mRNA yıkımı ile RISC post-transkripsiyonel gen susturulmasını gerçekleştirmiş olur ve böylece ilgili hedef proteinin miRNA-aracılı downregülasyonu sağlanmış olur (28). RISC yapısı, mRNA'ya kısmi (inkomplet) veya tam (komplet) bir şekilde bağlanarak mRNA'dan protein sentezini engellemiş

olur (Şekil 2.4). miRNA ve hedefi olan mRNA arasındaki ilişki, miRNA'nın 5' ucu ile sınırlıdır. Hedef dizinin tanınmasında 2-8 nükleotid arasındaki dizi (seed bölgesi) ve bağlanma bölgesindeki komplementerlik düzeyi çok önemlidir. Bu yol ile miRNA'lar hedef mRNA'ya 3'UTR bölgesinden bağlanırlar. Olgun miRNA'nın mRNA üzerindeki hedef bölgesine bağlanması iki şekilde sonuçlanır. Eğer miRNA hedef mRNA'ya eksik bütünleyicilik ile bağlarsa (9-12 nükleotid bölgesinden) yarı uyum oluşur ve ilgili mRNA'nın translasyonu ve destabilizasyonunu baskılayarak translasyonu regüle eder. Eğer olgun miRNA hedef mRNA'ya tam bütünleyicilik ile bağlanıyorsa AGO2 endonüklez aktivitesi ve mRNA deadenilasyonunun hızlandırılması yoluyla mRNA'nın poli-A kuyruğu yıkılır ve mRNA degrade olur ve sonuçta translasyon miktarı daha fazla azalmış olur. Genellikle baskılayıcı olarak işlev görse de miRNA'lar bazen translasyonun artmasına da neden olabilmektedir (34). Ayrıca RISC kompleksi translasyonun başlamasından sonra da mRNA'ya bağlanabilir ve ribozomlar erken ayrılarak translasyon sonlanır.



**Şekil 2.4:** Mikro RNA'ların bağlanma bölgelerine uyumluluğuna göre işlevleri (46)

Bir miRNA hedef dizilerin özelliklerine göre birçok genin ifadesini etkileyebilmekte, yüzden fazla transkriptin ekspresyonunu düzenleyebilmektedir. Buna karşılık olarak bir tek gen de eğer transkribe olduğu mRNA üzerinde birçok miRNA'ya uygun komplementer dizi bulunuyorsa farklı miRNA'lar tarafından regüle edilebilir. Bu faktörler nedeniyle yüksek derecede karışık düzenleme mekanizmaları oluşmaktadır (47).

### 2.2.3. Mikro RNA'ların Hastalıklardaki Rollerini

Mikro RNA'lar çok geniş spektrum içerisinde dağılan, gelişimsel ve hücrel süreçlerde gen ekspresyon düzenlenmesinde görev alırlar. Hem aktive edici hem de baskılayıcı etkileri gözlenmektedir. Dokunun gelişmesi, hücre çoğalması, hücre bölünmeleri, nöronal asimetri, kök hücre özellikleri, apoptozis, viral enfeksiyon gibi çok sayıda süreçte etkili olmaktadır ve miRNA ekspresyon anomalileri ile pek çok hastalığın gelişimi arasında doğrudan ilişki vardır (34).

Gen regülasyonundaki ve regülasyon bozukluklarındaki etkileri günümüzde miRNA'ların önemli bir araştırma alanı olmasını sağlamıştır. Normal dokularda düzenli miRNA transkripsiyonu ve hedef mRNA'ya bağlanması ile protein translasyonu genellikle bloke edilerek normal aralıklarda büyüme, proliferasyon, diferensiasyon ve hücre ölümü sağlanmaktadır.

Kanser, insanlarda miRNA'ların hastalıklar ile ilişkili olduğu ilk saptanan ve bugüne kadar miRNA'lar ile ilgili en çok araştırmanın yapıldığı alan olmuştur. miRNA'ların tümörögenezisteki rolleri çok yoğun olarak incelenmiştir. İnsan normal ve tümör dokuları karşılaştırıldığında, miRNA ekspresyon düzeyleri farklılık göstermektedir. miRNA'lar hem onkogen hem de tümör baskılayıcı gen etkisi göstermektedirler ve tümörögenez sürecinde anahtar rol oynamaktadırlar. Örneğin, miR-200 ailesi epitelyal-mezenşimal transizyonda rol almaktadır. Tümörlerde, miR-200 ailesinin CpGA aşırı metilasyonu, transkripsiyonel baskılayıcı olan *ZEB1* ve *ZEB2* artışına, bu aşırı ekspresyon da E-caderin (*CDH1*) sentezini durdurmaktadır (48).

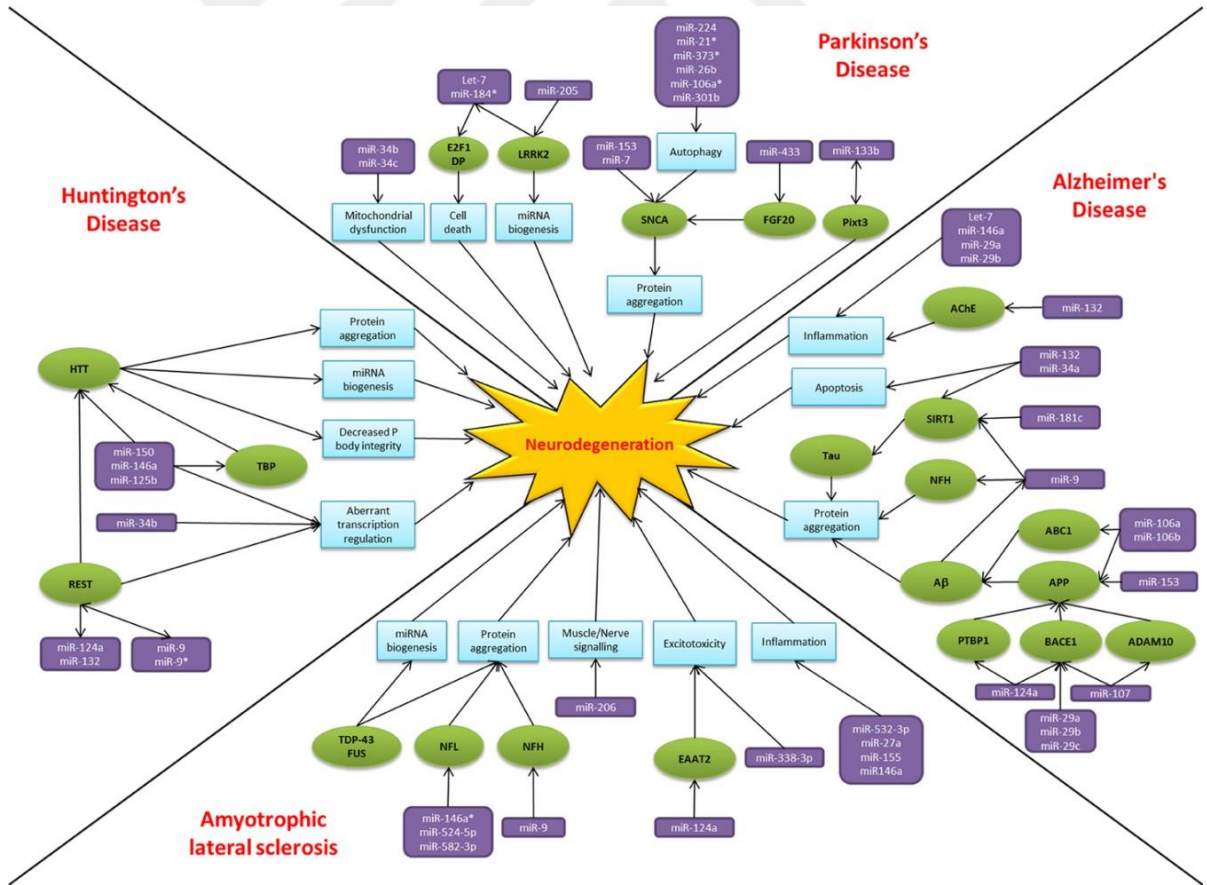
Kanserde miRNA anomalileri, epigenetik değişiklikler ve genetik anomaliler nedeniyle olabilir, primer miRNA transkript üretimi, matür miRNA dönüşümü ve/veya hedef mRNA ilişkileri etkilenebilir. Örneğin, B-hücreli KLL'lerde kromozom 13q14 delesyonu sonucu, miR-15 ve miR-16 anomalileri nedeniyle hastalık gelişebildiği ilk olarak saptanan-miRNA kanser ilişkisidir. miRNA'lar over ve meme karsinomları ile melanomlarda kromozomların daha çok frajil bölgelerinde lokalizedirler (34). Kanser ile ilişki kurulmuş miRNA'lar genomda daha çok kırılma



bölgelerinde, amplifikasyon bölgelerinde, heterozigotluğun kaybolduğu bölgelerde ve fragil bölgelerde yerleşmişlerdir.

*TARBP2*, *DICER1* ve Exportin 5 (*XPO5*) gibi miRNA biyogenezinde görev alan genlerdeki anomaliler, miRNA regülasyon anomalilerine, dolayısıyla düzenleme görevlerinin yitirilmesine bağlı olarak hücresel transformasyona yol açmaktadır. Tümör tipine göre miRNA tipleri, onkogenik/tümör baskılayıcı rolleri ve miRNA anomalileri değişkenlik göstermektedir. Ancak, tümörlerde miRNA ekspresyon profilleri genel miRNA üretimi defektleri ile karakterizedir ki bu da global miRNA ekspresyonunun azalmasında neden olmaktadır (34).

Nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde de miRNA disfonksiyonlarının rolü olduğu bilinmektedir. Alzheimer, Parkinson, Huntington ve Amyotrofik Lateral Skleroz hastalıkları etiolojisinde miRNA'ların etkili olduğu gösterilen nörodejeneratif hastalıkların en çok bilinenlerindedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Mikro RNA'ların nörodejeneratif hastalıklardaki başlıca rolleri(49)

Genomdaki değişiklikler de miRNA aktivitelerinde düzensizliklere yol açmaktadır. Down Sendromu hastalarında 21. Kromozomun ekstra kopyasında fazladan bulunan miR-155'in upregülasyonu nedeniyle komplemet faktör H aktivitesi baskılanırken doğal immün sistemin beyindeki primer nöroglial hücrelerinde aşırı inflamasyon artışına ve erken yaşta Alzheimer gelişimine yol açtığı gösterilmiştir (50). Trizomi13 hastalarında da aynı şekilde fazladan kromozom kopyasında ekspresyonu artan miR-15a ve miR-16-1 etkisiyle *MYB* geninin baskılanması sonucunda hastalarda myoglobin proteininin daha az seviyelerde olması ve gama globin gen ekspresyonunun doğumdan sonra baskılanmasının gecikmesi nedeniyle HbF'in postnatal dönemde persistan olarak yüksek seyretmesi durumu açıklanmıştır (13).

Bunların dışında, immün sistem hastalıkları, kardiyovasküler sistem hastalıkları ve birçok hastalık etiopatogenezinde miRNA'ların önemi araştırılmaya devam etmektedir. Bugüne kadar onlarca hastalık grubunda yüzlerce miRNA ve hastalık ilişkisi gösterilmiştir (51). Bazı hastalık grupları ve ilişkili olduğu bildirilen başlıca miRNA'lar aşağıdaki tabloda sıralanmıştır.

**Tablo 2.6:** Hastalıklarda rol oynadığı bildirilen başlıca miRNA'lar

Hastalık	miRNA	Hastalık	miRNA
Küçük hücreli dışındaki Akciğer Kanseri	let-7	Rett Sendromu	miR-14a, miR-146b, miR-29, miR-382
Kronik Lenfositik Lösemi	miR-15a, miR-16	5q Sendromu	miR-145, mir-146a
Meme kanseri, Pankreas kanseri	miR-21	ICF Sendromu	miR-34b, miR-34c, miR-99b, miR-125a
Kolon kanseri	miR-106a	Crohn Hastalığı	miR-196
Papiller tiroid kanseri	miR-221	Sağrlık	miR-96
Romatoid artrit	miR-155, miR-146a	Alzheimer	miR-29, miR-146, miR-107
Hepatoselüler Kanser	niR-122	Parkinson	miR-7, miR-184, let-7
Psöriazis	miR-203	Sistemik Lupus Eritematosus	miR-189, miR-61, miR-78, miR-21, miR-142-3p
Down Sendromu	miR-99a, let-7c, miR-155, miR-802	Russel-Silver Sendromu	miR-96

#### 2.2.4. Mikro RNA'ların Tanı, Prognoz ve Tedavide Kullanımı

Mikro RNA'ların hastalıkların patogenezindeki etkilerinin ortaya çıkması, bu moleküllerin tanı, prognoz ve tedavide de kullanılabileceğini gündeme getirmiştir. Kanser dokularında miRNA profilinin normal dokulara göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Solid doku tümörlerinden yapılan çalışmalarda özellikle hücre içi miRNA'ların düzeyi farklı olduğu tespit edilirken diğer kanser türleri ve çeşitli hastalıklarda da dolaşımda bulunan miRNA'ların da değişiklik gösterdiği saptanmıştır.

Biyobelirteç olarak kullanılması planlanan miRNA'ların ilk kez serumdaki varlığı Lawrie ve arkadaşları tarafından 2008 yılında gösterilmiştir (52). Aynı yıl Mitchell ve arkadaşları tarafından insan plazma ve serumunda miRNA'ların varlığı tespit edilmiştir (53). Sonrasında miRNA'lar idrar, tükürük, beyin omurilik sıvısı ve süt dahil olmak üzere vücut sıvılarında geniş oranlarda tespit edilmiştir (54). Bu sayede araştırmacılar dolaşımdaki miRNA seviyelerini hastalar ve sağlıklı kontroller arasında kıyaslayarak tanısal ve prognoz amaçlı biyobelirteç olarak kullanımı ile ilgili çalışmalara başlamışlardır (24).

Dolaşan miRNA'lar; eksozomal miRNA'lar (ex-miRNA), RNA-binding proteinlere bağlı miRNA'lar ve lipoproteinlere bağlı miRNA'lardan oluşmaktadır. Eksozomların yeterli ve istikrarlı bir miRNA taşıyıcısı olduğu bilinmektedir. Dolaşan miRNA tespiti ile noninvaziv tümör tanısı günümüzde en popüler araştırma alanlarından biridir (55).

Solid doku tümörlerinde miRNA'lar tümör tanısında (56), tümör tespiti ve tiplendirmesinde (57), tümör orjininin belirlenmesinde ve prognoz belirlemede kullanılabilmektedir. Dolaşımdaki miRNA'ların da noninvaziv tümör tanısında, sınıflandırılmasında ve subtiplendirilmesinde (58), metastazı öngermeye (59), tümör progresyonunu, ciddiyetini öngermeye (60, 61), tedaviye cevabı ve direnç gelişimini değerlendirmede (62, 63) faydalı olduğu gösterilmiştir. Tüm bu özellikleri ile miRNA'lar tanı, prognoz tahmini, ekstraselüler biyobelirteç, yeni tedavi hedefleri yaklaşımlarında araç olarak değerlendirilmektedir. Örneğin; miR-21 ve meme kanseri hakkında yapılan çalışmalar ile bir miRNA'nın hem hücre içi ve hücre

dışında bir biyobelirteç olabileceği, prognostik önemi olduğu hem de bir tedavi hedefi olabileceğine dair örnekler gösterilmiştir (64).

miRNA temelli tedavi yaklaşımları da günümüzde önemli bir araştırma alanıdır. Sentetik yapıdaki miRNA antogonistlerinin ve mimik miRNA'nın asıl miRNA gibi hedef mRNA'ya bağlanarak translasyonu susturduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (65, 66). Antagomirler, kimyasal olarak üretilmiş yeni bir oligonukleotid grubudur. Bu grup, spesifik miRNA'ya mükemmel bir şekilde tamamlayıcı özellik gösteren küçük sentetik RNA moleküllerinden oluşmaktadır. Antagomirler, endojen miRNA'ların fonksiyonlarını bastırmak amacıyla kullanılırlar (67). MikroRNA maskesi ise Xiao ve arkadaşları tarafından dizayn edilen, endojen miRNA'ların hedef gen bölgesiyle mükemmel komplementerlik gösteren spesifiknükleotid dizileridir (68).

Mikro RNA'ların kanser patogenezindeki rollerinin gösterilmesinden sonra bu moleküllerin kanser tedavisinde de kullanılabileceği öngörülmüştür. Onkogen olarak görev yapan miRNA'yı hedef olarak tanıyıp bağlanan 'antogomir' adlı antimiRNA oligonukleotidleri sentezlenmiştir. Antagomir, hedef miRNA'ya bağlanıp onu bloke ederek onkojenik aktiviteyi durdurur. Ayrıca, tümör baskılayıcı gen olarak görev yapan bazı miRNA'ların sentetik analogları yapılmıştır. Bunlarla hücrenin transkripsiyonu sonucu da onkojenik aktivite baskılanmış olur. miRNA ve RNA interferans ile ilgili başka bir tedavi yöntemi de antisense oligonükleotidlerdir. Bunlar, onkogene ait mRNA'ya komplet bir şekilde bağlanıp onu bloke ederek mRNA'dan protein sentezini engeller ve dolayısı ile o onkogeni susturmuş olurlar.

Tedavi çalışmaları henüz çok yeni olmakla birlikte dozaj ayarlaması, hedef dışı gen susturmaları, hedef dokuya ulaşım sorunları ve istenmeyen yan etkiler gibi nedenlerle tedavide zorluklar bulunmaktadır. İnsanlarda miRNA tedavi hedefi üzerine yapılan ilk klinik çalışma kronik hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu tedavisinde miR-122'yi hedef alan Miravirsen (SPC3649) ile yapılmıştır. Faz II çalışmaları 2013 yılında yayımlanmıştır (69). Bunun dışında prelinik çalışmaları devam eden onlarca miRNA hedefi bulunmaktadır. Kalp yetmezliği tedavisi için miR-208a inhibitörü, kanser tedavisi için miR-34a stimülanı gibi tedavi adayları bulunmaktadır. MRX34 ise tümör supressör protein p53 taklidi ile kanser

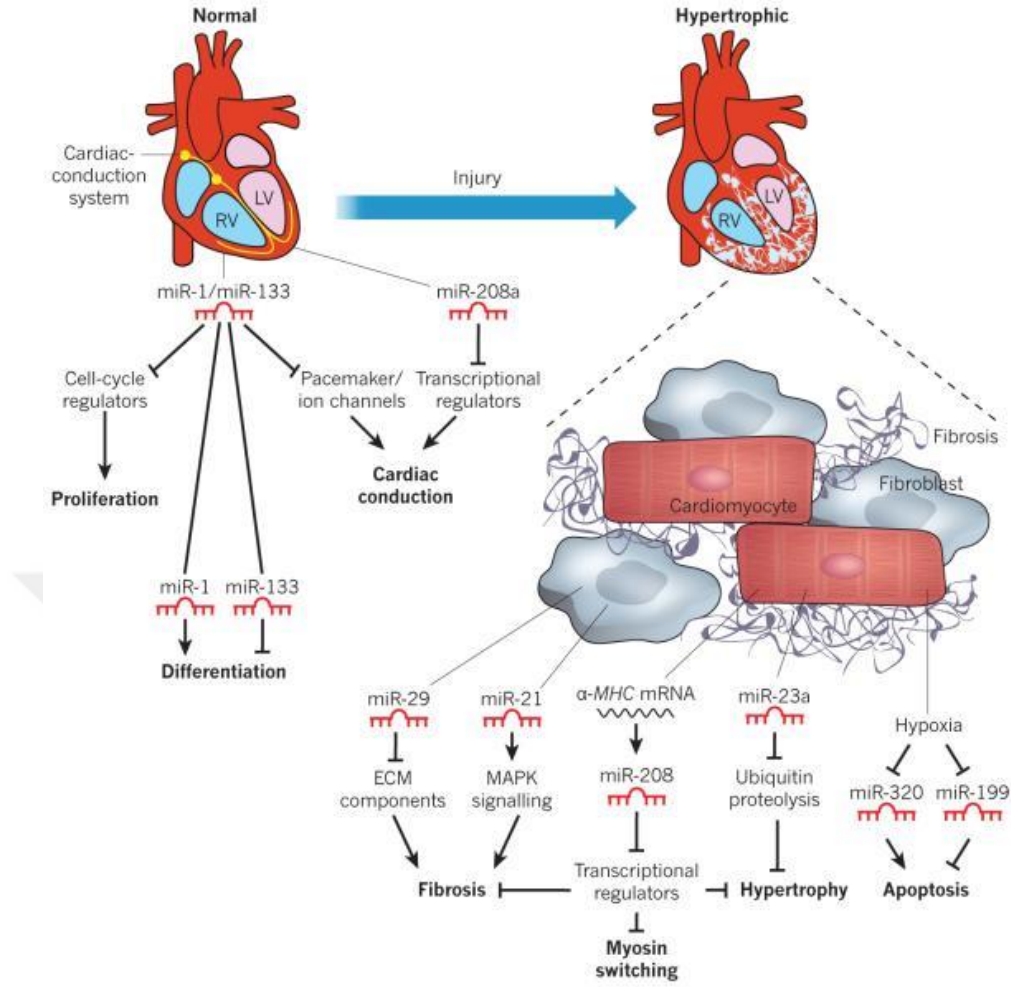
büyümesini inhibe ettiği gösterilmiş Nisan 2013'te hepatosellüler karsinom hastalarında faz I denemeleri yapılmıştır fakat ciddi immün yan etkilerinden dolayı çalışma sonlandırılmıştır (70).

### 2.2.5. Kardiyovasküler Sistem ve Mikro RNA'lar

KVS hastalıklarının etiyolojisinde yer alan hücrel ve moleküler mekanizmaların anlaşılmasına rağmen ve de tanıda, prognoz tayininde ve tedavide geniş araçlar kullanılmasına rağmen bugün gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde KVS hastalıkları ile ilişkili mortalite ve morbidite ciddi bir problem olarak devam etmektedir. Hastalık sıklığının artması ile birlikte bu hastalıkların patolojisine yönelik ileri moleküler mekanizmalara ve yenilikçi tedavi yaklaşımlarına olan ihtiyaç da büyümektedir (25).

Mikro RNA'lar kardiyak dokularda gelişimin her evresinde rol almaktadır ve fetal kalpte yüksek oranlarda eksprese edilmektedir (71). miRNA'lar vasküler hücre farklılaşması, çoğalması, yaşamı, metabolizması ve gelişmesi gibi vasküler işlevlerin çok geniş bir aralıkta post-transkripsiyonel düzenleyicileri olarak görev almaktadır (18). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile bazı kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde miRNA'ların rolü olduğuna dair kuvvetli bulgular birikmektedir (72).

Kardiyak gelişim, farklı hücre hatlarından gelen kardiyomiyositler, endokardiyal, epikardiyal ve vasküler hücreler, fibroblastlar ve iletim sistemindeki hücreler gibi farklı hücre tipleri arasında hassas ve karışık etkileşimleri gerektirmektedir. Belirli miRNA'ların bazı kardiyak hücre tiplerine özgü olarak artış gösterdiği bilinmektedir. Embriyonik kök hücre farklılaşması, kardiyomiyosit proliferasyonu, kasılma, iyon kanallarının regülasyonu ve kardiyak iletimin oluşması sırasında miRNA'lar rol almaktadırlar. (Şekil 2.6). miR-1 ve miR-133 proliferasyonu, farklılaşmayı ve kardiyak iletimi düzenleyerek normal bir kalbin gelişiminde yer almaktadırlar. Örneğin, hücre döngüsü regülatörleri tarafından proliferasyon desteklenirken miR-1 ve miR-133 tarafından bu regülatörler bloke edilerek proliferasyon düzenlenmektedir. miR-208a da iletim sisteminin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (73).



**Şekil 2.6:** Normal ve hipertorfik kalpte miRNA'ların fonksiyonel rolü (73)

Kalp hasarından sonra bazı miRNA'lar patolojik remodelling ve kalp yetmezliğine geçişe katkıda bulunmaktadır. miR-29 ekstraselüler matriks bileşenlerinin ekspresyonunu inhibe ederek fibrozisi bloke ederken, miR-21 MAPK sinyal yolağını uyararak fibrozisi desteklemektedir. miR-208 miyozin izoform dönüşümünü, kardiyak hipertrofiyi ve fibrozisi kontrol etmektedir. miR-23a hipertrofiyi engelleyen ubiquitin proteolizini inhibe ederek kardiyak hipertrofiye yol açmaktadır. Hipoksi sonucuda, miR-320 ve miR-199 baskılanması aracılığıyla ayrı apoptozis uyarılmakta ve bloke edilmektedir (73).

miRNA dayalı araştırmalar ve potansiyel klinik uygulamalar bugün tüm dünyada büyük bir hızla devam etmektedir. Yakın zamanlarda keşfedilmesine rağmen miRNA araştırmaları KVS hastalıkları ve tedavisinde önemli yeniliklere öncülük etmektedir. Klinik bakış açısından miRNA'lar değerli tanısal ve prognostik

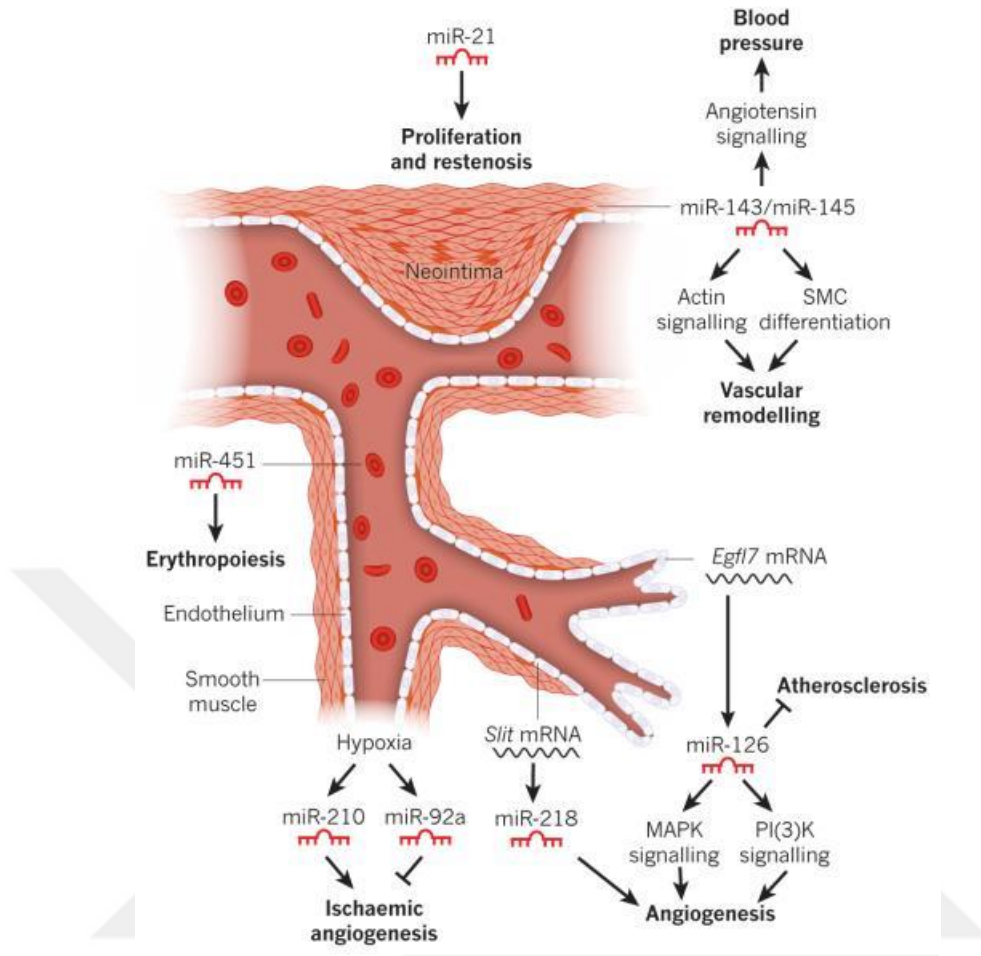
belirteçler sağlamaktadır (24). miRNA'lar aracılığı ile vasküler genlerin mutasyonlarının ve/veya hatalı ifadelerinin düzenlemesi KVS hastalıklarının mekanizmasında etkili olan vasküler sinyal yollarında önemli sonuçlar oluşturmaktadır. Bu yüzden KVS hastalıkları tanı ve tedavisinde potansiyel araç olarak değerlendirilmektedir. Gen düzenlenmesindeki anahtar rolleri sayesinde miRNA'lar umut veren tedavi hedefleri sağlamaktadır. KVS hastalıkları için yapılan hayvan modellerinde tedavilerde çok büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. miR-25 inhibisyonu ile yetmezliğe giden kalpte kasılma fonksiyonlarının iyileştiği, miR-208a'nın tedavi amaçlı inhibisyonunun kalp yetmezliği sırasında kardiyak fonksiyonları artırdığı, miR-33 antagonizması ile farelerde kolesterol transportunun tersine döndüğü ve aterosklerozun gerilediği gösterilmiştir (74-76). Bu konuda insan klinik araştırmaları ise henüz başlama aşamasındadır. Hangi miRNA'ların hangi yöntemlerle bu hastalıklarda translasyonu baskılayarak ve mRNA yıkımını başlatarak etkili olabileceğini anlamak için kesin kaynaklarının, yerinin, rollerinin aydınlatılması gerekmektedir. Bunun için dolaşımdaki miRNA'lar üzerinde yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (24).

#### **2.2.6. Mikro RNA'ların Koroner Arter Hastalığı ve Akut Koroner Sendromdaki Rolü**

Mikro RNA'ların dolaşımında bulunduğu tespit edilmesinden sonra özellikle de Akut MI ve kalp yetmezliğinde yeni belirteçler olarak araştırılmaya başlanmıştır. Şu ana kadar yapılan çalışmaların sonuçlarına göre miRNA'ların Akut MI tanısında kardiyak troponin gibi geleneksel belirteçlere benzer şekilde ve Akut MI sonrası prognoz belirlemede risk tahmini modellemelerinde değerli bir belirteç olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır (24).

Vasküler sistemin oluşumunda ve hastalıklarında da miRNA'ların rol oynadığı tespit edilmiştir. KVS görevini tam olarak yapabilmesi için damar düz kas hücrelerinin endotelial hücrelerle eş zamanlı olarak olgunlaşması ve uygun kan akımının kasılmalarla ve gerekli tonus ile sağlanması gerekmektedir. Vasküler gelişimin bu basamaklarını yöneten bazı miRNA'lar gösterilmiştir (Şekil 2.7). Hipoksi, miR-210 ve miR-92a'nın aktive olması ile anjiyogenezisin ayrı ayrı artması ve inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. *Egfl7* geninin intronları tarafından kodlanan





**Şekil 2.7:** Vasküler sistemde miRNA'ların fonksiyonel rolü (73)

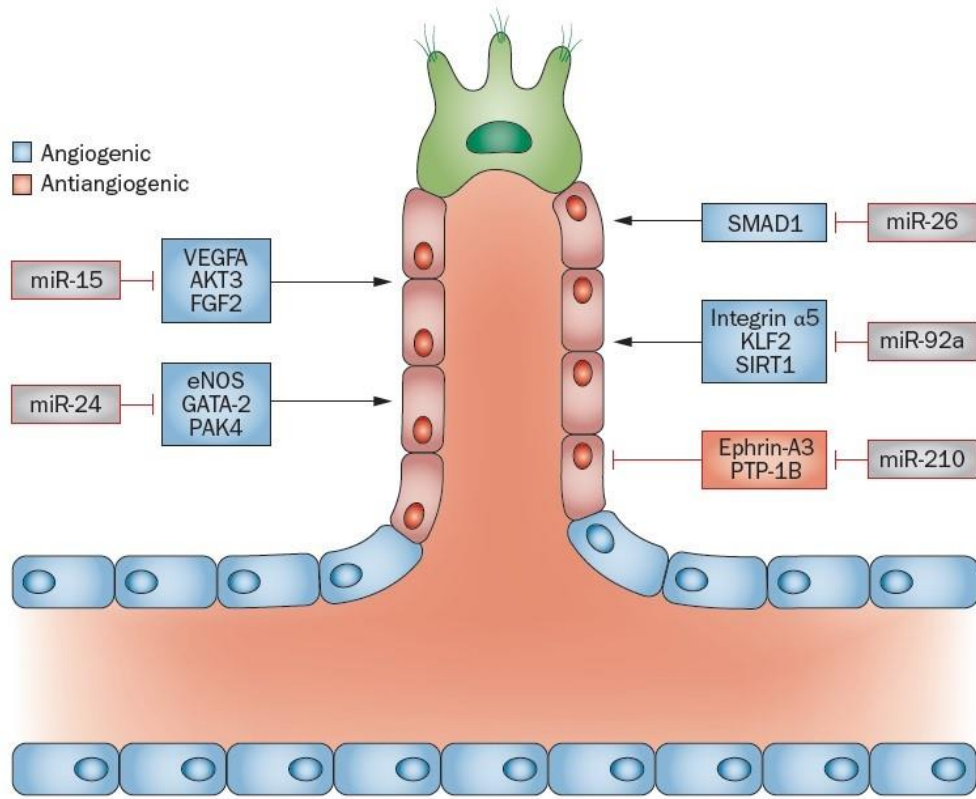
endotelial hücrelerden zengin olarak bulunan miR-126 ise, aterosklerozis ve anjiyogenezisi MAPK ve PI(3)K sinyal yolları aracılığı ile düzenlemektedir. Anjiyogenezis ayrıca *Slit* genlerinin intronları tarafından kodlanan miR-218 tarafından da düzenlenmektedir. miR-143 ve miR-145 düz kas hücrelerinde eksprese olarak kan basıncını ve vasküler tonusu kontrol ederken vasküler remodelling sürecine de katkıda bulunmaktadır. Vasküler hasardan sonra miR-21'in düz kas hücreleri tarafından uyarılmasıyla proliferasyon ve neointima oluşması sağlanmaktadır. Kırmızı kan hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması da miR-451 tarafından düzenlenmektedir (73).

Endotel hücrelerinin işlev bozukluğu veya kaybı bozulmuş anjiyogenezisin karakteristik bir özelliği olarak kabul edilir ve iskemik kalp hastalığının, vasküler hastalıkların, inflamasyonun ve aterosklerozisin gelişmesine öncülük eder. 'Angiomirna'lar adı verilen bir grup miRNA anjiyogenik işlemlerin ve yanıtların



düzenlenmesinde rol alırlar. Mir-126 vasküler bütünlüğü sağlar ve anjiyogenezisin ana düzenleyicisi olarak endotel hücrelerinde rol alır (19).

Anjiyogenezis rejenere olmuş kalp kasının oksijeninin ve beslenmesinin sağlanması için de kritik öneme sahiptir. Bazı miRNA'ların anjiyogenezisi artırdığı veya baskıladığı gösterilmiştir (Şekil 2.8). Örneğin miR-15, miR-24, miR-26 ve miR-17~92 ailesindeki miRNA'lar anjiyogeneziste etkili olan genlerin endotel hücredeki işlevlerini inhibe ederek antiangiyojenik etki göstermektedirler. Tam tersine miR-210 ise antiangiyojenik faktörleri inhibe ederek anjiyogenezisi aktive etmektedir (77).



**Şekil 2.8:** Anjiyogenezis üzerine etkili olduğu gösterilmiş başlıca miRNA'lar (77)

KVS gelişimi ve hastalıklarında rolleri olduğu bilinen miRNA ailelerinin en önemlilerinden biri de miR-17-92 ailesidir. Kardiyomiyosit farklılaşması ve proliferasyonunda görevleri olan bu miRNA'lar aynı zamanda endotel hücrelerinin büyümesini de desteklemektedirler. KAH ve AKS durumunda kardiyomiyositlerin proliferasyonunu artırmakta, kalp fonksiyonlarını iyileştirmekte ve skar alanını azaltmaktadırlar. miR-19 iskemik hasardan korurken miR-92a endotel hücrelerin anjiyogenezisini sınırlamaktadır. İskemi sonrası reperfüzyon

hasarını da miR-19b apoptozisi sınırlayarak ve kardiyomiyositlerin sağ kalımını artırarak hafifletmektedir. Bu miRNA'lar aynı zamanda hücre döngüsündeki hedefleri aracılığıyla kardiyak fibroblastların yaşlanmasını engellemektedirler (78).

Akut MI gelişimi ve miRNA'ların ilişkisi ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. Bugüne kadar yapılmış en geniş kapsamlı çalışmada, Devaux ve arkadaşları tarafından acil servise akut göğüs ağrısı ile gelen 1155 hastanın kanından altı ayrı miRNA'nın seviyeleri ölçülmüş ve 224 Akut MI tanısı alan hastada mir-208b, mir-499 ve mir-320a düzeylerinin belirgin olarak diğerlerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (79). Wang ve arkadaşları ise Akut MI erken tanısında miRNA'ların troponin seviyelerinin plazmada tespitinden daha önce kullanılabilir bir belirteç olabileceğini çalışmalarında önermişlerdir. Kardiyak spesifik miR-208a'nın plazmada yükselmesinin insanlarda miyokart hasarının erken tespiti için yeni bir biyobelirteç olabileceğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda miyokardit ve kalp yetmezliğini içeren KVS hastalıklarının izlenmesi ile kardiyak cerrahi sırasında miyokardın korunması için değerlendirilmesi sırasında da kandaki miRNA'ların duyarlı bir biyobelirteç olabileceğini dile getirmişlerdir (80). Widera ve arkadaşları da instabil anjina'ya bağlı olarak MI gelişmiş hastalarda miR-1, miR-133a ve miR-208b düzeylerinin artmış olduğunu ve AKS hastalarında biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini belirtmişlerdir (81).

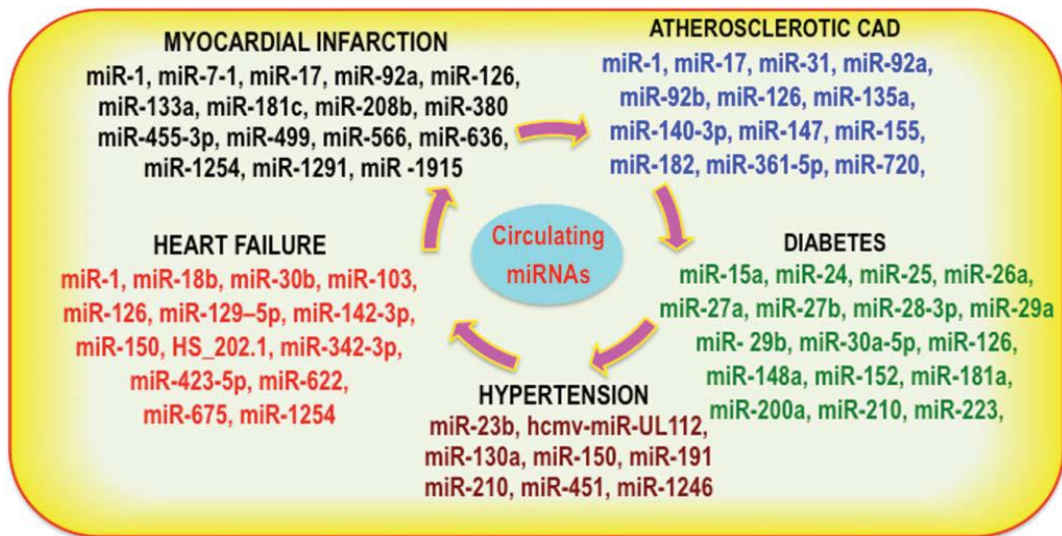
KAH izlemine yönelik yapılan miRNA çalışmalarında ise oldukça önemli sonuçlar elde edilmiştir. Zampetaki ve arkadaşları prospektif bir KVS hastalık çalışmasında 10 yıllık takip sonucunda üç miRNA'nın (mir-126, mir-197 ve mir-223) Akut MI vakalarının gelişmesindeki riski tahmin edici değeri olduğunu göstermişlerdir (82). Buradan elde edilen veriler Framingham Risk Skorlamasına eklendiğinde sonuçların daha yüksek özgüllüğe sahip olacağı vurgulanmıştır. Bu sonuçlar miRNA'ların gelecekteki Akut MI riskini belirlemede potansiyel prediktif bir role sahip olabileceğini ortaya koymaktadır.

Fichtlscherer ve arkadaşları ise stabil KAH üzerine yaptıkları çalışmada endotel hücrelerinde ekspresyonu bulunan miR-126, miR-92a, ve miR-17 downregüle olduklarını tespit etmişlerdir. Düz kas hücrelerinde bulunan miR-145 ve

inflamasyon ile ilişkili miR-155'in de belirgin olarak stabil KAH hastalarında downregüle olduklarını belirlemişlerdir (83).

AKS sonrasında post-iskemik anjiyogenezisin düzenlenmesinde miRNA'ların rollerinden yola çıkarak sağ kalımı artırmak ve komplikasyonları azaltmak amacıyla tedavi hedefleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Wang ve arkadaşları miR-126 nakavt farelerde iskemik olay sonrası neovaskülerizasyonun daha hızlı olduğunu göstermişlerdir (19). Hu ve arkadaşları ise, MI mürin modellerinde vektörler aracılığıyla miR-210'un taşınması ile bu miRNA'nın fazla ekspresyonunun anjiyogenezisi artırdığını tespit etmişlerdir (84). Ghosh ve arkadaşları da fare modellerinde miR-424 ekspresyonu ile post-iskemik yanıt arasında fizyolojik bir ilişki olduğunu bu miRNA'yı modüle ederek ortaya koymuşlardır (85).

Dolaşımdaki kararlılıkları sayesinde günümüzde miRNA'lar Akut MI, kalp yetmezliği, aterosklerotik hastalıklar, tip 2 diabetes mellitus (T2DM) gibi KVS hastalıklarında potansiyel belirteç olarak araştırılmaktadır (Şekil 2.9). Belirteçlerin erken dönemde tespiti ile hastalık komplikasyonları gelişmeden birkaç yıl önce hatta T1DM ve T2DM'de hastalık belirtileri görülmeden miRNA profili yardımı ile erken tespit edilme imkânı ile kişilerin sağlık durumlarında büyük gelişmelere katkı sağlaması beklenmektedir (25). Ayrıca KVS hastalıklarının başlangıcından önce dolaşımda görülen aday belirteçlerin varlığı da obezite gibi 'kardiyovasküler hastalık öncesi durumu'nun erken tanı almasını sağlamaya yardımcı olmaktadır (86).



Şekil 2.9: Kardiyovasküler sistem hastalıklarında dolaşımdaki başlıca miRNA'lar (25)

### 2.2.7. miRNA profillendirme

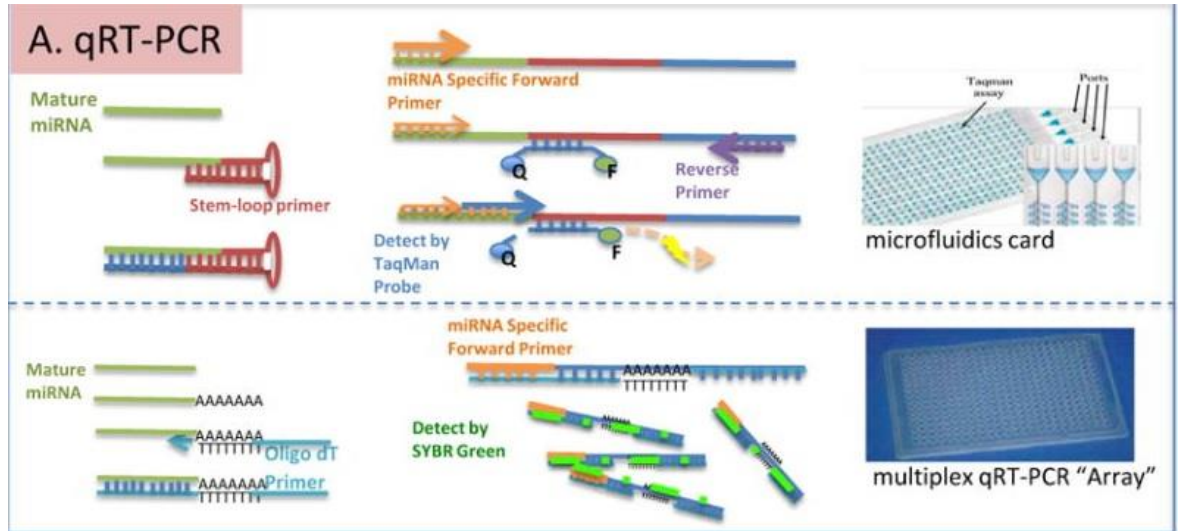
Gen ifadesini belirlemede geleneksel olarak kullanılan yöntemlerin yanında günümüzde çok daha geniş kapsamlı araştırmalar yapmaya olanak sağlayan yeni teknikler ve cihazlarla ekspresyon çalışmaları yapılabilmektedir. Yapılan araştırmanın amacına yönelik olarak iyi bir örnekleme metodu ve kaliteli bir şekilde RNA çıkarımından sonra farklı miRNA profillendirme yöntemleri çalışılmaya başlanabilmektedir. Yapısal ve işlevsel özelliklerinden ve kendine özgü farklılıklarından dolayı miRNA ekspresyonlarının belirlenmesi sırasında revers transkripsiyon ve polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) sırasında kullanılan geleneksel primerlerden farklı özelliklerde primerler ve teknikler geliştirilmiştir. Bu amaçla iyi bir şekilde tasarlanmış ve yerleşmiş olan en sık kullanılan başlıca yöntemler şunlardır: Eş zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR), hibridizasyona dayalı metodlar (DNA mikroarrayler gibi) ve yüksek çıktılı olan dizileme yöntemleri (RNAseq gibi). miRNA profillendirmede kullanılan bu üç önemli yaklaşımın temel özellikleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (87).

**Tablo 2.7:** miRNA profillendirme yöntemlerinin özellikleri ve karşılaştırılması

Özellik	qRT-PCR	Mikroarray	RNAseq
<b>Kantitatif duyarlılık</b>	Mutlak miktar tayini için kullanılabilir	Mutlak miktar tayini yapamaz	Mutlak miktar tayini yapma potansiyeli var
<b>Dinamik aralık</b>	Yüksek dinamik aralık	Düşük dinamik aralık	Orta dinamik aralık
<b>Maliyet</b>	Orta	Düşük	Yüksek
<b>Yeni miRNA tespiti</b>	Yeni miRNA tespiti yapamaz	Yeni miRNA tespiti yapamaz	Yeni miRNA tespit edebilir
<b>isomiR ve varyantların tespiti</b>	isomiR ve varyant tespiti yapamaz	isomiR ve varyant tespiti yapamaz	isomiR ve varyantlarını tespit edebilir
<b>Gerekli RNA miktarı</b>	Çok düşük miktarlar yeterli	Düşük miktarlar yeterli	Orta miktarlar yeterli
<b>Avantajları</b>	Duyarlı ve özgül, özelleştirilebilir ve uyumlu, mutlak miktar tayini	Ucuz, daha çok sayıda paralel ölçüm imkanı, iki durumun göreceli karşılaştırılmasına uygun	Yüksek doğruluk ve duyarlılık, yeni miRNA tespiti, isomiR ve varyant tespiti
<b>Sınırlılıkları</b>	Yeni miRNA tespit edemez	Düşük duyarlılık, doğrulama gerekli, yeni miRNA tespit edemez	Pahalı, veri analizi için özel hesaplama desteği gerekli

### 2.2.7.1 Eş Zamanlı Niceliksel Polimeraz Zincir Reaksiyon Metodu (qRT-PCR)

Mikro RNA'ların profillendirilmesinde başlıca yöntemlerden biri miRNA'nın revers transkripsiyonu ile cDNA'ya dönüşümünün ardından kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile reaksiyon ürünlerinin birikiminin eş zamanlı olarak görüntülenmesidir (87). qRT-PCR, klasik PCR'a göre hassaslık, özgüllük, doğruluk ve pratiklik gibi birçok avantajı bulunan deneysel olarak miRNA'ların saptanıp ölçülebileceği ve miRNA profillendirmede kullanılan en önemli metotlardan biridir. Bu yöntemle pikogram düzeyleri ( $1\text{pg}=10^{-12}$  g) kadar az total RNA kullanılarak, etkin ve doğru sonuçlar almak mümkün iken yeni miRNA tespitinin olmaması bu yöntemin en önemli kısıtlılığıdır. qRT-PCR yöntemi genel olarak en geniş dinamik aralığa ve en yüksek doğruluğa sahip olan ve mutlak miktar tayininin yapılabildiği metottur. Bu çok önemli özelliklerinin yanında; olgun miRNA'ların kısa (15-27 nt) olması, olgun miRNA'lardaki GC miktarlarının farklılıklar göstermesinden dolayı miRNA'ların erime sıcaklıkları arasında büyük farklılıklar oluşması, olgun miRNA'nın revers transkripsiyonunda poly(A) özelliği olmaması ve aynı ailede yer alan miRNA'ların sadece birkaç baz farklılığa sahip olmaları gibi miRNA'ların yapısal özelliklerinden dolayı qRT-PCR'ın kullanımında da zorluklar olabilmektedir (88).



Şekil 2.10: miRNA profillendirmede kullanılan başlıca qRT-PCR teknikleri (87)

Revers transkripsiyon reaksiyonunda cDNA elde edebilmek için iki ana yöntem kullanılmaktadır (Şekil 2.10):

1) Primer bağlanma bölgesinde bir stem-loop primeri kullanılarak bir revers transkripsiyon başlatılmaktadır.

2) *E.coli* poly(A) polimerazı kullanarak poly(A) kuyruğu 3' ucuna eklenmekte ve oligo d(T) primerleri kullanılmaktadır.

Bu yöntemlerin qRT-PCR aşamasında ise iki farklı şekilde amplifikasyonlar tespit edilmektedir. İlk yöntemde diziye özgü probler kullanılır. Buprobler qRT-PCR cihazları tarafından saptanabilecek florofor içerirler ve DNA'daki özgül bölgesine bağlanırlar. Hidroliz (TaqMan) probları, moleküler beacon, hibridizasyon probları, LightUp prob, scorpion prob ve single problar gibi çok farklı şekillerde tasarlanmış problar bulunmaktadır. İkinci yöntemde ise diziye özgü olmayan belirleme yöntemiyle "SYBR Green I" gibi DNA'nın çift iplikli haline bağlanan floresan boyalar kullanılır. Ortamda çift iplikli DNA miktarı arttıkça ışımaya da doğru orantılı olarak artar. SYBR Green, çift sarmallı DNA moleküllerine bağlanması sonucu belli dalga boyunda uyarılarak yine belli dalga boylarında ışımaya yapar. Tepkimede döngü sayısı ilerledikçe daha fazla çift sarmallıDNA molekülü sentezlendiği için daha fazla SYBR Green DNA'ya bağlanır ve daha fazla ışımaya yapar (89).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma prospektif klinik bir araştırma olup Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 27.10.2015 tarih ve 2015/07-8 sayılı kararı ile etik kurul onayı (EK1) alınarak Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik, Kardiyoloji ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalları ile ortaklaşa gerçekleştirilmiştir. Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başkanlığının 01.12.2015 tarih ve 2015/05-10 sayılı kararı ile çalışma desteklenmiştir.

#### 3.1. ÇALIŞMA GRUBU

T. C. Sağlık Bakanlığı Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Bölümüne Kasım 2015-Mart 2016 tarihleri arasında KAH ve AKS ön tanıları ile kabul edilip tanı ve tedavi amaçlı koroner anjiyografi yapılan olgulardan; koroner anjiyografisi normal olan ( $<50\%$  darlık, non-obstrüktif) 45 olgu, koroner arterlerinde kritik darlık saptanıp ( $\geq 50\%$  darlık, obstrüktif) KAH tanısı alan 45 olgu, koroner arterlerinde tam tıkanıklık saptanıp akut MI tanısı alan 45 olgu olmak üzere toplam 135 olgu çalışmaya dâhil edilmiştir.

Daha önceden akut koroner sendrom nedeniyle koroner anjiyografi yapılmış olan hastalar ile son dönem böbrek yetmezliği hastalığı olan, gebe ve gebelik sonrası ilk 6 ayında olan, yeni teşhis edilmiş veya tedavi edilmiş kanser tanısı alan, sistemik bir enfeksiyonu olup genel durumu iyi olmayan ve serebrovasküler olay geçirmiş olan hastalar çalışma dışında tutulmuştur.

Genetik çalışmalar için bilgilendirilmiş gönüllü olur formu (EK2) her hasta için doldurulup imzalandıktan sonra çalışmaya katılmayı ve örnek vermeyi kabul eden hastalardan, koroner anjiyografi işlemi sırasında serum tüplerine 5'er ml periferik kan örneği alınmıştır. Bu hastaların yaş, cinsiyet gibi demografik özellikleri yanında KAH için belirlenen hipertansiyon, diabetes mellitus, hiperlipidemi, sigara kullanımı ve aile hikâyesi gibi risk faktörleri sorgulanarak kaydedilmiştir. Koroner arter tutulumu olup olmamasına göre hastalar normal, koroner arter hastası ve akut MI hastası olmak üzere üç ayrı grup oluşturularak sınıflandırılmıştır.



## 3.2. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

### 3.2.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Serum eldesi, RNA izolasyonu, cDNA dönüşümü, Real Time ekspresyon çalışması ve elde verilerin istatistiksel analizi için Tıbbi Genetik Anabilim Dalına bağlı Genetik Tanı Merkezi Laboratuvarlarında mevcut araştırma olanaklarından aşağıdaki tabloda bulunan cihaz ve aletler çalışmada kullanılmıştır.

**Tablo 3.1:** Projede Kullanılan Mevcut Makine-Teçhizat Listesi

Adı / Modeli	Projede Kullanım Amacı
Rotor-Gene Q Real Time PCR Cihazı/ Qiagen	Gerçek Zamanlı Amplifikasyon
Thermal Cycler (Isı döngüleyici) Cihazı/SensoQuest	Revers Transkripsiyon ile cDNA dönüşümü ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)
Derin Dondurucu (-86 °C) / Operon	Serum, RNA ve cDNA muhafaza etmek
Buzdolabı (-20 °C) / Vestel	Kit, kimyasal ve solüsyonları saklamak
Buzdolabı (+4 °C) / Arçelik	Kit, kimyasal ve solüsyonları saklamak
Spektrofotometre / Thermo Scientific NanoDrop	Nükleik asit (RNA) konsantrasyon ve saflığını ölçmek
Çalkalamalı İnkübatör / Eppendorf	Sıvıları çalkalayarak inkübe etmek
Güç Kaynakları / Necron, Esişpower	Cihazlara güç sağlamak
Orbital Shaker Çalkalayıcı/ Cleaver	Sıvıları doğrusal ve dairesel biçimde çalkalamak
Vortex / Pro	Santrifüj tüplerindeki sıvıları karıştırmak
Masaüstü Soğutmalı Santrifüj / Eppendorf- 5424 R	Çöktürme ve ayırma işlemi
Masaüstü Çok Amaçlı Santrifüj / Eppendorf	Çöktürme ve ayırma işlemi
Mikrosantrifüj / Hettich Zentrifugen	Çöktürme ve ayırma işlemi
Thermo Santrifüj / Thermo Scientific	Çöktürme ve ayırma işlemi
Masa Üstü Bilgisayar / Exper	Verilerin Kaydı ve Analiz Programının Kullanılması
Renkli Yazıcı / Lexmark	Çıktı Almak
UV Sterilizasyon Kabini / Cleaver	Steril Ortam Sağlamak



<b>Sterilizatör / Electro-mag</b>	Sterilizasyon
<b>Laminar Air Flow / Nuaire</b>	Çalışma Ortamının Sterilizasyonu ve Homojenliğini Sağlamak
<b>Buz Makinesi / Fiocchetti</b>	Buz Yapımı
<b>Otoklav / Stik</b>	Buharla Sterilizasyon
<b>Ultra Saf Su Cihazı / Direct-Q</b>	Solüsyonların hazırlanması, yıkama işlemleri
<b>Mikropipet setleri (1–10 µl, 10–100 µl ve 10–100 µl) / Axygene, Gilson</b>	Kimyasal, solüsyon ve sıvıları pipetlemek

### 3.2.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Kimyasallar

Serum eldesi, RNA izolasyonu, cDNA dönüşümü, Real Time ekspresyon çalışması için aşağıdaki sarf malzemeleri ve kimyasallar kullanılmıştır.

- Steril eldiven
- 10 cc'lik serum tüpleri
- 1.5 ml'lik eppendorf tüpleri (DNase free, RNase free)
- 2 ml'lik toplama tüpleri (DNase free, RNase free)
- Steril Filtreli Pipet Uçları (10-100-1000 µl'lik)
- DNase, RNase Free Water
- miRNeasy Mini Kit (Serum/plazma RNA izolasyon kiti / Qiagen)
  - RNeasy MinElute spin kolonu: RNA'ların karışımdan toplanması için
  - Qiazol: Serumdaki taşıyıcı proteinleri ve diğer kılıfları parçalayıp RNA'yı açığa çıkarabilmek için
  - Kloroform: Faz ayrımının yapılarak RNA'nın DNA ve proteinlerden ayrılabilmesi için
  - Etanol: Qiazol ve kloroformun fazla etkisini giderebilmek için
  - RWT buffer: Tampon görevi görüp RNA'ların spin kolonuna daha iyi yapışması ve saflığının artması için
  - RPE buffer: Tampon görevi görüp RNA'ların spin kolonuna daha iyi yapışması ve saflığının artması için

- miScript II RT Kit (cDNA dönüşümü kiti / Qiagen)
  - 5x miScript HiSpec tampon: olgun miRNA'ların cDNA'ya seçici dönüşümünde kullanılan tampon
  - 10x miScript Nükleik asit karışımı: dNTP'leri, rATP ve oligo-dT primerlerini içerir
  - miScript Reverse Transcriptase Mix: RNA kalıbından cDNA sentezi için gerekli olan poly(A) polimeraz ve revers transkriptaz enzimlerini içerir
- miScript SYBR Green PCR Kit (Kantitatif real time ekspresyon kiti / Qiagen)
  - 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
  - 10x miScript Universal Primer
- Strip Tubes and Caps 0.1 ml'lik qRT-PCR tüpleri
- miScript Primer Assays (Olgun miRNA primerleri / Qiagen)
  - MS00008582 (hsa-miR-128-3p)
  - MS00031563 (hsa-miR-196a-5p)
  - MS00031815 (hsa-miR-373-3p)
  - MS00031829 (hsa-miR-375)
  - MS0003374 (*RNU6-6P*: RNA, U6 small nuclear 6, pseudogene )

### 3.3. YÖNTEMLER

Serum elde edilmesi, total RNA izolasyonu, cDNA dönüşümü ve real time ekspresyon analizi yöntemleri kullanılarak aşağıdaki çalışma basamakları sırasıyla izlenmiş ve toplam 135 örnek için tüm protokoller uygulanarak veriler elde edilmiştir.

#### 3.3.1. Serum Elde Edilmesi

Çalışma gruplarından 10 ml'lik serum tüplerine kan örnekleri alındı. Kan örneği alındıktan sonra birkaç kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve alınan kan örnekleri en geç 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılıp aşağıdaki basamaklar izlenerek serum kısımları ayrıldı.

1. Steril eldivenler giyilerek tüpler mikrosantrifüj aletine aynı hacimli olanlar karşılıklı gelecek şekilde dizildi. 3600 rpm'de 15 dk. süreyle santrifüj edildi (Santrifüj aleti aniden durdurulmamalı, santrifüj kendi kendine ve yavaş yavaş durmalıdır).

2. Santrifüj sonrası serum tüpünde üç ayrı faz oluştu:

-En altta kanın şekilli elemanlarının pıhtı oluşturarak çöktüğü koyu kırmızı bir tabaka,

-Ortada ince 'buffy coat' adını verdiğimiz beyaz kan hücreleri ve plateletlerden oluşan beyaz bir tabaka,

-En üstte dolaşımdaki serbest RNA'ların da içinde bulunduğu şeffaf serum tabakası oluştu.

Santrifüj işlemi sonunda tüpler sarsılmadan dikkatlice santrifüjden çıkartıldı, tüplerin kapakları yavaşça ve sarsılmadan açıldı.

3. 200 µl'lik pipetlerle 5 kezde toplam 1000 µl olacak şekilde tüpün üst kısmında toplanan serum 1.5 ml'lik DNaz ve RNaz içermeyen steril eppendorf tüplerine aktarıldı (Bu işlemler alttaki hücresel kısım rahatsız edilmeden DNaz ve RNaz içermeyen steril filtreli pipet uçları ile yapılmalıdır).

4. Toplanan 1000 µl'lik bu örnekler masaüstü çok amaçlı santrifüj aletine karşılıklı gelecek şekilde dizildi. 13000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve tüpün en üst kısmından 200 µl'lik kısım yeni bir eppendorf tüpüne konuldu. Yedekleme amacıyla bir eppendorf tüpü için daha örnek alındı (200 µl'lik 2 örnek saklandı).

**Not:** Yapılacak olan çalışma sayısına göre daha fazla serum örneği ayrı ayrı alikotlama yapılarak saklanabilir.

5. Elde edilen serum örnekleri -80 °C'de saklanmak üzere derin dondurucuya aktarıldı.

### 3.3.2. RNA İzolasyonu

Serum örneklerinden RNA izole etmek için Qiagen miRNeasy serum/plazma Kit kullanıldı. Serumdan total RNA izolasyon çalışma protokolü şu şekilde yapıldı:

1. Örnekler -80 °C den çıkarılarak +4 °C de çözünmesi beklendi.
2. Eppendorf tüplerinden 200 µl ( RNeasy MinElute spin kolonu için kullanılabilecek maksimum serum miktarı) serum örneği alınarak 2 ml'lik toplama tüplerine konuldu ve üzerine 5 kat hacimde (1000 µl) QIAzol Lysis Reagent eklenerek vortekslendi, iyice karışması sağlanarak tüm RNA'ların açığa çıkması sağlandı.
3. Karışım 5 dk. oda sıcaklığında hafif el ile alt üst ederek inkübe edildi.
4. Başlangıç materyali kadar (200 µl) kloroform eklendi. 1 dakika boyunca karışımın içerisinde beyaz topaklar kalmayana dek iyice vortekslendi (Çalkalama işleminin iyi yapılmış olması faz ayırımına avantaj sağlar).
5. 2-3 dakika oda sıcaklığında hafif alt üst edilerek beklendi.
6. Tüpler +4 °C'de 12000xg hızında 15 dk. süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında kloroform sayesinde homojen hale gelmiş olan dokuda faz ayrımı sağlandı ve böylece RNA, DNA ve proteinler birbirinden ayrıştırılmış oldu. Toplama tüpünde üç ayrı faz oluştu:
  - En üstte RNA içeren renksiz şeffaf sulu faz
  - Ortada DNA içeren beyaz renkli ara faz
  - En altta protein içeren pembe-kırmızı renkli faz
7. Oluşan üç fazdan en üstte bulunan sulu kısmından 600 µl alınarak yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne transfer edildi (Ara fazdan alınmaması gerekir). 1,5 katı kadar hacimde (900 µl) %100'lük saf etanol eklendi. Pipetlenerek iyice karışması sağlandı.
8. 700 µl örnek alınarak RNeasy MinElute spin kolonuna yüklendi (kolona bir defada yüklenebilecek maksimum örnek miktarı 700 µl'dir) ve 15-25 °C'de 8000xg hızında 15 saniye süreyle santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpünde

süzülen sıvı döküldükten sonra tüp kolonun altına tekrar yerleştirilerek kullanıldı. 1500 µl örneğin tamamı kolona yüklenene kadar bu basamak tekrarlandı.

**9.** 700 µl Buffer RWT, RNeasy MinElute spin kolonuna eklenerek 15 saniye süreyle 8000xg hızında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpünde süzülen sıvı dökülerek tüp tekrar kullanıldı.

**10.** 500 µl Buffer RPE, RNeasy MinElute spin kolonuna eklenerek 15 saniye süreyle 8000xg hızında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpünde süzülen sıvı dökülerek tüp tekrar kullanıldı.

**11.** 500 µl %80'lik etanol, RNeasy MinElute spin kolonuna eklenerek 2 dakika süreyle 8000xg hızında santrifüj edildi ve alttaki toplama tüpü değiştirildi.

**12.** RNeasy MinElute spin kolonu 2 ml'lik yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Kolon kapağı açık bırakılarak maksimum hızda 5 dakika boyunca membran kuruyana dek santrifüj edildi (Kapaklar dönme yönünün tersi yönünde açık olacak şekilde tüpler dizilmelidir).

**13.** RNeasy MinElute spin kolonu 1,5 ml'lik yeni toplama tüpüne yerleştirildi. 14 µl RNaz içermeyen su spin kolonunun merkezine direkt olarak eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında beklenerek maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.

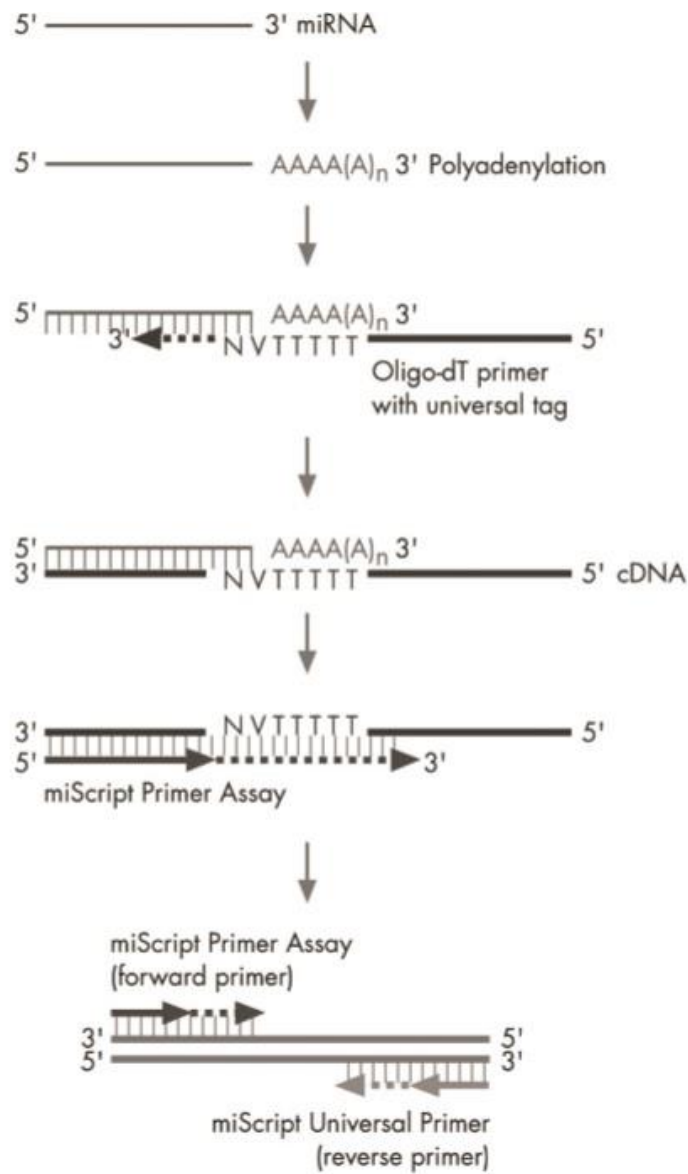
**14.** Konsantrasyonu artırmak için elde edilen elüsyon tekrar aynı RNeasy MinElute spin kolonuna yüklenerek 5 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi (Kolonun ölü hacmi 2 µl kabul edildiği için toplam 12 µl RNA (total RNA eldesine miRNA'lar da dahil ) elde edilmiş oldu).

**15.** Elde edilen RNA'lar - 80 °C'de saklanmak üzere derin dondurucuya aktarıldı.

**Not:** Serum/plazma çalışmalarında elde edilen RNA konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre Nanodrop cihazı ile ölçüldüğünde hücre ve doku hatlarından elde edilenlere göre çok daha düşük değerlerde bulunmaktadır. Bu konsantrasyon ve saflık dereceleri kantitatif real time ekspresyon çalışmaları için yeterlidir.

### 3.3.3. cDNA Dönüşümü

İzole edilen RNA örneklerinden Qiagen miScript II RT (Reverse Transcription) Kiti kullanılarak cDNA (complementary DNA, tamamlayıcı DNA) dönüşümü yapıldı. Şekil 3.1’de gösterildiği gibi cDNA dönüşümü poliadenilasyon ve oligo-d(T) primerleri kullanılarak daha sonraki aşamada olgun miRNA primerlerine uyumlu olarak real time ekspresyonunda kullanılabilir şekilde kit bileşenleri tarafından gerçekleştirildi.



**Şekil 3.1:** miScript HiSpec tamponu ve oligo-dT primerleri kullanılarak olgun miRNA’ların özgül olarak cDNA’ya dönüşümü (90).

miScript HiSpec Tamponu ile revers transkripsiyon reaksiyonu sırasında olgun miRNA'lar poli(A) polimeraz tarafından poliadenile edilir ve revers transkriptaz tarafından oligo-dT primerleri eklenerek cDNA'ya dönüştürülür. Oluşan cDNA daha sonra olgun miRNA ekspresyonu sırasında real-time PCR reaksiyonunda kullanılır.

cDNA dönüşümü aşağıdaki protokol izlenerek yapıldı:

1. RNA soğuk blok üzerine alınarak çözünmeye bırakıldı.
2. 5x miScript HiSpec Buffer, 10x miScript Nükleer Mix ve RNaz içermeyen su oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı (miScript Reverse Transcriptase Mix ise enzimin ısı ve ışıktan etkilenmemesi için karanlık ortamda ve buzdolabında tutularak sadece karışım hazırlandığı an çıkarılmalıdır).
3. Her bir örnek için Tablo 3.2'de belirtildiği gibi 5x miScript HiSpec tampondan 4 µl, 10x miScript Nükleik asit karışımından 2 µl, miScript Reverse Transcriptase Mix'ten 2 µl olacak şekilde hesaplanarak revers transkriptaz reaksiyonu karışımı soğuk blok üzerinde hazırlandı.
4. Revers transkriptaz karışımına 12'şer µl RNA eklenerek pipetlenip iyice karışması sağlandı (Son hacim 20 µl oldu).

**Tablo 3.2:** cDNA dönüşümü için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Tepkime Hacmi
5x miScript HiSpec tampon	4 µl
10x miScript Nükleik asit karışımı	2 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
Kalıp RNA	12 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20 µl</b>

5. 37 °C’de 60 dakika (inkübasyon),

95 °C’de 5 dakika (enzimlerin inhibisyonu),

4 °C’de bekleme olacak şekilde PCR protokolü ayarlandı ve örnekler thermal cyclers cihazına (Şekil 3.2) yüklendi.

6. Cihazdan çıkan cDNA’lar 1/6 oranında seyreltilerek (üzerine 120 µl RNaz içermeyen su eklenerek ) real time ekspresyon çalışmasında (qRT-PCR) kullanılmaya hazır hale getirildi.

7. cDNA’ların kullanım ömrünü uzatmak için -80 C’de muhafaza edildi.



Şekil 3.2: Thermal Cyclers Cihazı (SensoQuest)

### 3.3.4. qRT-PCR (Quantitative Real Time-PCR, Eş Zamanlı-PCR)

Real-Time PCR reaksiyonu Qiagen miScript SYBR Green PCR kiti ve miScript Primer Assays kullanılarak gerçekleştirildi. qRT-PCR çalışmaları için aşağıdaki işlemler yapıldı:

1. Çalışmada elde edilen örneklerden anjiyogenezis sürecinde rolleri olduğu bilinen genlerle ilişkili olgun hedef miRNA’ların (Tablo 3.3) ekspresyonları ölçümü amacıyla *KLF4* geni için hsa-miR-128-3p, *HOXA5* geni için hsa-miR-196a-5p, *SIRT1* geni için hsa-miR-373-3p, *PTPN1* geni için ise hsa-miR-375 seçildi.



**Tablo 3.3:** Hedef miRNA'lar ve ilişkili genler

Olgun hedef miRNA	miRTarBase ID (41)	İlişki kurulacak gen
hsa-miR-128-3p	MIRT021926	<i>KLF4</i>
hsa-miR-196a-5p	MIRT006906	<i>HOXA5</i>
hsa-miR-373-3p	MIRT006158	<i>SIRT1</i>
hsa-miR-375	MIRT00545580	<i>PTPNI</i>

2.Olgun hedef miRNA'lar seçildikten sonra ilgili mikro RNA primerleri (Tablo 3.4) sipariş edildi. Real time ekspresyon çalışması öncesinde primerler 550 µl TE (pH 8.0) ile kullanıma hazır hale getirildi. Primerler alikotlanarak -20°C'de saklandı.

**Tablo 3.4:**Olgun Hedef miRNA primer dizileri

Olgun hedef miRNA	Ürün kodu	Lot No	miRBase ID	Primer dizisi
hsa-miR-128-3p	MS00008582	20160323124	MIMAT0000424	5'UCACAGUGAAC CGGUCUCUUU
hsa-miR-196a-5p	MS00031563	20151002148	MIMAT0000226	5'UAGGUAGUUUC AUGUUGUUGGG
hsa-miR-373-3p	MS00031815	20150910129	MIMAT0000726	5'GAAGUGCUCUCG AUUUUGGGGUGU
hsa-miR-375	MS00031829	20151002152	MIMAT0000728	5'UUUGUUCGUUC GGCUCGCGUGA

3. Her bir örnek için Tablo 3.5'de belirtildiği gibi soğuk blok üzerinde tepkime bileşenleri hazırlanarak uygun tüplere cDNA'lar dağıtıldı. 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix'ten 10 µl, 10x miScript Universal Primer'den 2 µl, 10x miScript Primer Assay'den 2 µl, RNaz içermeyen sudan 1 µl olmak üzere örnek sayısı kadar hesaplanarak çalışılacak primer adedince real time ekspresyon reaksiyonu için karışım hazırlandı. Hazırlanan karışımlar tüplere dağıtılıp ilgili örneklerden önceden sulandırılmış cDNA'lar 5'er µl strip tüplerine eklenerek pipetlendi ve tüplerin kapakları kapatılarak reaksiyona hazır hale getirildi.

**Tablo 3.5:**qRT-PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Hacim
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
10x miScript Universal Primer	2 µl
10x miScript Primer Assay (ilgili miRNA primeri)	2 µl
RNaz içermeyen su	1 µl
cDNA (1/6 sulandırılmış)	5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>20 µl</b>

4. Strip tüplerinde hazırlanan karışımlar qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) cihazı (Şekil 3.3) rotor-diskinde her bir örnek ve primerin sırası için ayrılan kuyucuğa yerleştirildikten sonra Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 programında da ilgili örnek sıra numaralarına primer ve örnek adları yazılarak kaydedildi.



**Şekil 3.3:** Real-Time PCR amplifikasyon cihazı (Qiagen Rotor-Gene Q )

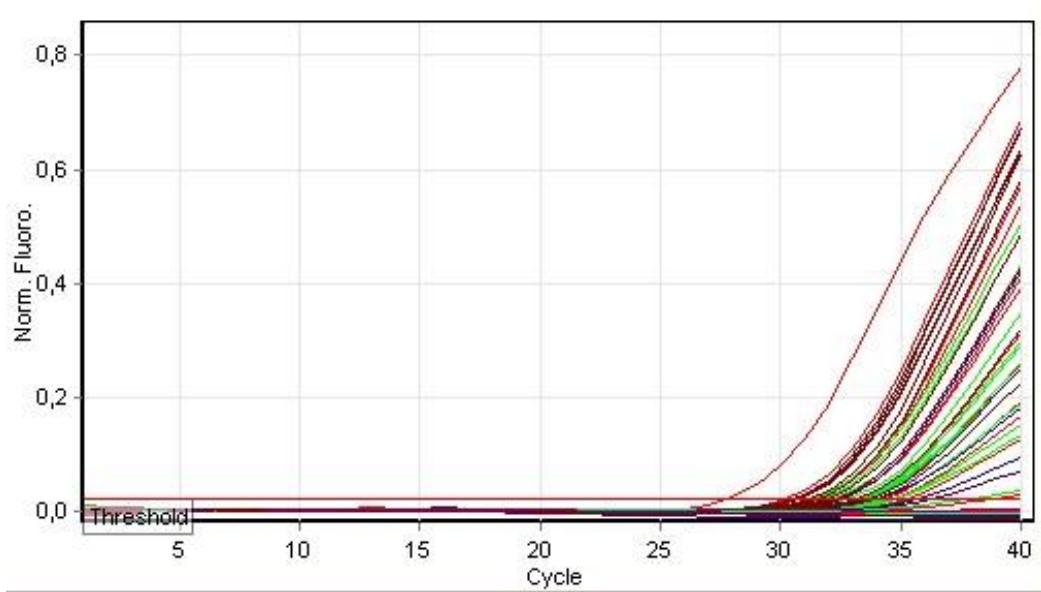
5. Real-time PCR işlemi için Tablo 3.6’da ki gibi qRT-PCR tepkime koşullarına göre program ayarları kaydedildi. 95 °C’de 15 dakika süreyle başlangıç aktivasyon (Taq DNA Polimeraz aktivasyonu) aşamasından sonra; 94 °C’de 15 saniye süreyle denaturasyon, 55 °C’de 30 saniye süreyle annealing (bağlanma), 70 °C’de 30 saniye süreyle extension (uzama) (floresan ışımalar green kanalında bu aşamada toplanır) olacak şekilde 40 döngüde qRT-PCR işlemi bitirildi.

**Tablo 3.6:** qRT-PCR Tepkime Koşulları

Sıcaklık	Zaman
95 °C	15 dk.
94 °C	15 sn.
55 °C	30 sn.
70 °C	30 sn.

} 40 döngü

6. qRT-PCR işlemi sonrasında CT (cycle threshold) (CT değerleri; real-time PCR deneylerinde floresan sinyal miktarının gözlemlenmesi için gereken minimum eşik değerinin geçildiği döngü sayısına verilen addır) değerleri her bir örnek için kontrol edilerek verilerin istatistikseldeğerlendirilmesine geçildi. Her bir kuyucuk için floresan ışımaları (Şekil 3.4) ve bu ışımalar için hesaplan CT değerleri tek tek incelendi. CT değerlerinin doğruluğunu gösterebilmek için Erime Eğrisi (Melt Curve) analizi yapıldı. Primer çiftleşmesi veya spesifik olmayan PCR ürünleri çalışma sonuçlarından çıkarıldı. Negatif kontrollerin eğri oluşturup oluşturmadığına ve erime eğrisine bakıldı. Tekrar edilmesi gereken çalışmalar için yeniden qRT-PCR işlemi tekrar yapıldı. Tekrar deneyleri de bittikten sonra kontroller yapılarak tüm çalışmalar için treshold değeri aynı olacak şekilde ayarlanarak nihai CT değerleri hesaplandı ve veriler analiz dosyasına kaydedildi.



**Şekil 3.4:**qRT-PCR amplifikasyonu sırasında floresan ışımaya eğrilerinin görünümü

### 3.4. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ

1. Real-time PCR çalışmaları tamamlandıktan sonra kaydedilen CT değerleri her üç çalışma grubu için örnekler yan yana olacak şekilde gruplandırıldı ve her örnek için çalışılan CT değerleri bir sütunda olacak şekilde tablo oluşturuldu. Olgun hedef miRNA'lar da diğer satırlara alt alta sıralandı ve tabloda her örnek için karşısına olgun hedef miRNA'nın CT değeri yazıldı. CT değerleri için cut off 35 olarak alındı. CT değeri 35 ve altı olan örneklerin eksprese olduğu kabul edildi. Hiç amplifikasyon eğrisi oluşturmayan örnekler 'None' olarak belirtilerek eksprese olmadığı kabul edildi. CT değeri 35 ve üzeri olanlar ise cut off değerinin dışında kaldığından anlamsız olarak kabul edildi.

2. Hazırlanan bu tablo Qiagen Sabiosciences tarafından hazırlanan ve <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php?target=upload> web adresinden erişilebilen "RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Version 3.5" veritabanına yüklendi.

3. Ekspresyon analizi için  $\Delta\Delta CT$  formülü kullanıldı. Bu metoda göre  $2^{-\Delta Ct}$  ( $\Delta Ct = CT_{\text{Hedef gen}} - CT_{\text{Referans Gen}}$ ) formülü ile referans gen ve hedef genin CT değerleri arasındaki katlı değişimleri (fold change) hesaplandı.

4. Normalizasyon için Mestdagh ve ark. tarafından geliştirilen ortalama ekspresyon metodu kullanıldı. Bu yöntemle göre her örnek için eksprese olan tüm miRNA'ların ortalama ekspresyon değerleri normalizasyon faktörü olarak kabul edildi (91).

5. Çalışma gruplarının demografik özelliklerinde ve klinik bulgularında (hipertansiyon, diabetes mellitus, hiperlipidemi, sigara kullanımı, yaş ve aile öyküsü) görülen değişkenleri karşılaştırmak için  $\chi^2$  (ki-kare) testi kullanıldı. Bu istatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 22.0 istatistik programı kullanıldı.

6. Gruplar arasındaki miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı. Grupların demografik özelliklerinin ve klinik bulgularının (hipertansiyon, diabetes mellitus, hiperlipidemi, sigara kullanımı, yaş ve aile öyküsü) miRNA ekspresyonları ile ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde One-Way

ANOVA testi kullanıldı. Bu istatistiksel analizler için GraphPad Prism istatistik programı kullanıldı.

**7.** Tüm istatistiksel analizlerde çift yönlü  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  veya  $p<0.001$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ GENEL ÖZELLİKLERİ

Çalışma grupları belirlendikten sonra; koroner anjiyografisi normal olan (<%50 darlık, non-obstrüktif) 45 olgu ‘Kontrol grubu’, koroner arterlerinde kritik darlık saptanıp ( $\geq$ %50 darlık, obstrüktif) KAH tanısı alan 45 olgu ‘Grup 1’, koroner arterlerinde tam tıkanıklık saptanıp akut MI tanısı alan 45 olgu ise ‘Grup 2’ olarak kabul edildi. Toplam 135 olgunun demografik özellikleri ve diğer klinik bulguları Tablo 4.1’de özetlenmiştir:

**Tablo 4.1:** Çalışma gruplarının klinik ve demografik özellikleri

Veriler /Gruplar		Kontrol Grubu (n=45) (%)	Grup 1 (n=45) (%)	Grup 2 (n=45) (%)	Toplam (n=135) (%)
Cinsiyet	Kadın	30 (66,7)	12 (26,7)	15 (33,3)	57 (42,2)
	Erkek	15 (33,3)	33 (73,3)	30 (66,7)	78 (57,8)
Yaş	Ortalama	56,53	64,33	61,89	60,92
Diabetes Mellitus	Var	10 (22,2)	14 (31,1)	24 (53,3)	48 (35,6)
	Yok	35 (77,8)	31 (68,9)	21 (46,7)	87 (64,4)
Hipertansiyon	Var	26 (57,8)	32 (71,1)	32 (71,1)	90 (66,7)
	Yok	19 (42,2)	13 (28,9)	13 (28,9)	45 (33,3)
Hiperlipidemi	Var	16 (35,6)	12 (26,7)	15 (33,3)	43 (31,9)
	Yok	29 (64,4)	33 (73,3)	30 (66,7)	92 (68,1)
Sigara kullanımı	Var	7 (15,6)	27 (60,0)	19 (42,2)	53 (39,3)
	Yok	38 (84,4)	18 (40,0)	26 (57,8)	82 (60,7)
Aile öyküsü	Var	4 (8,9)	14 (31,1)	18 (40,0)	36 (26,7)
	Yok	41 (91,1)	31 (68,9)	27 (60,0)	99 (73,3)

Demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre çalışma grupları incelendiğinde Grup 2 ve Grup 1’de hastalığa yatkınlık oluşturan risk faktörlerinde anlamlı farklılıklar görülmektedir.  $\chi^2$  (ki-kare) testi sonuçlarına göre Diabetes mellitus ile gruplar arasında bir ilişki görülmektedir. Özellikle Grup 2’de diabetes mellitus sıklığı belirgin olarak yüksektir ( $p<0,05$ ). Hipertansiyon ve hiperlipidemi sıklıklarının gruplar arasında benzer şekilde dağıldığı görülmektedir. Sigara kullanımı ve aile öyküsü sıklıkları ise Grup 1 ve Grup 2’de kontrol grubuna göre

kıyasla belirgin olarak yüksektir ( $p<0,05$ ). Kontrol grubuna kıyasla Grup 1 ve Grup 2’de yaş ortalamasının arttığı görülmektedir. Yine kontrol grubuna kıyasla Grup 1 ve Grup 2’de erkek cinsiyetin daha fazla olduğu görülmektedir.

## 4.2. EKSPRESYON ANALİZİ BULGULARI

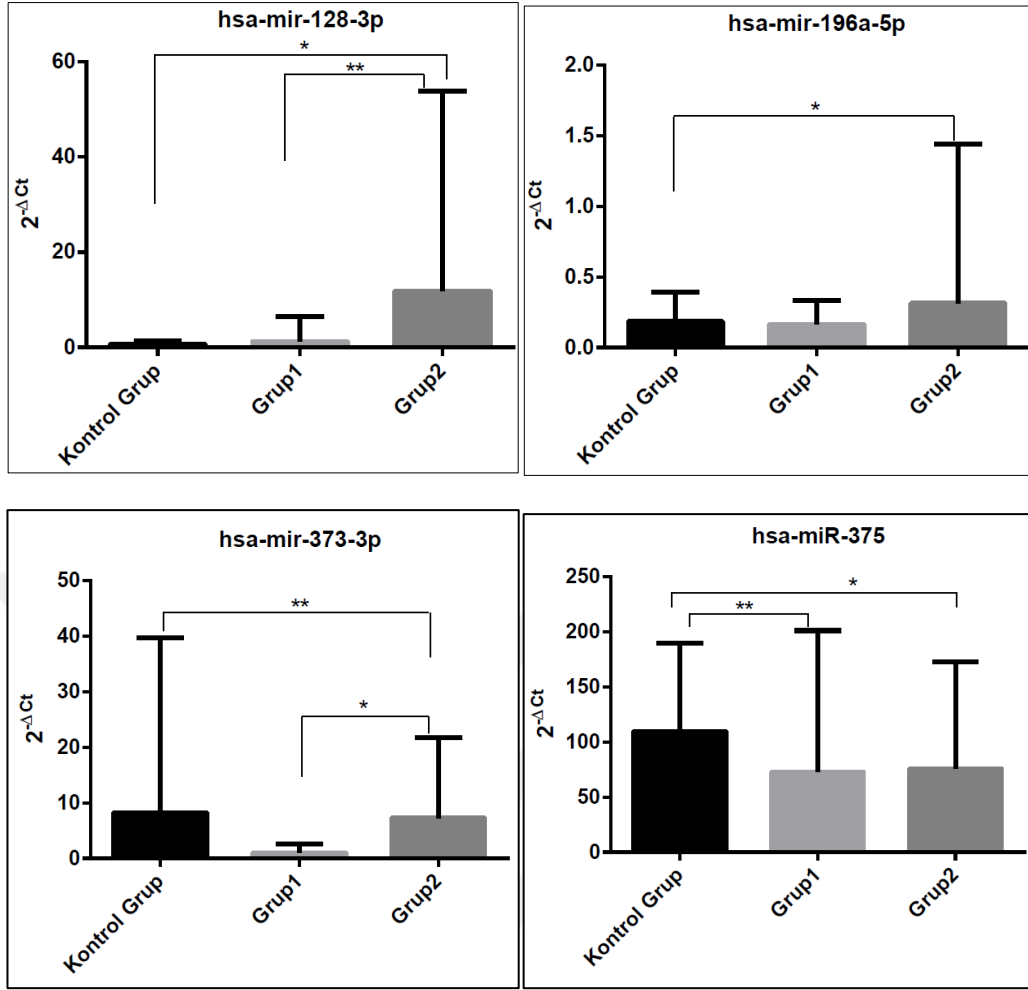
### 4.2.1. Çalışma Gruplarının miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

$2^{-\Delta Ct}$  değerleri kullanılarak seçilen olgun miRNA’ların ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmaları aşağıdaki grafik ve tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.2 ve Şekil 4.1).

**Tablo 4.2:** Çalışma grupları arasındaki miRNA ifade değişimlerinin p değerleri ile gösterimi

miRNA’lar	Gruplar	Grup1	Grup2
hsa-miR-128-3p	Kontrol grubu	0,0120	0,0664
	Grup1	-	0,0085
	Grup2	0,0085	-
hsa-miR-196a-5p	Kontrol grubu	0,7983	0,0127
	Grup1	-	0,0987
	Grup2	0,0987	-
hsa-miR-373-3p	Kontrol grubu	0,6219	0,0078
	Grup1	-	0,0241
	Grup2	0,0241	-
hsa-miR-375	Kontrol grubu	0,0064	0,0402
	Grup1	-	0,4072
	Grup2	0,4072	-

\* $p<0.05$ ve \*\* $p<0.01$  değerleri kırmızı ile gösterilmiştir.



**Şekil 4.1:**  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerine göre olgun miRNA ekspresyonlarının çalışma gruplarında istatistiksel olarak karşılaştırılması

(Grafiklerde p değerleri direkt olarak yazılmayıp \* $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.01$  sembolleri ile belirtilmiştir)

Wilcoxon testi sonuçlarına göre hsa-miR-128-3p için yapılan ekspresyon karşılaştırmalarında Grup 2 ile kontrol grubu arasında ( $p < 0.05$ ) ve Grup 2 ile Grup 1 arasında ( $p < 0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları bulunmuştur. Grup 1 ile kontrol grubu hsa-miR-128-3p ekspresyonları arasında ise istatistiksel olarak ifade farkı bulunmamıştır. hsa-miR-196a-5p için yapılan ekspresyon karşılaştırmalarında



Grup 2 ile kontrol grubu arasında ( $p<0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı bulunmuştur. Grup 1 ile kontrol grubu ve Grup 2 ile Grup 1 arasında hsa-miR-196a-5p ekspresyonları için istatistiksel olarak ifade farkı bulunmamıştır. hsa-miR-373-3p için yapılan ekspresyon karşılaştırmalarında Grup 2 ile kontrol grubu arasında ( $p<0.01$ ) ve Grup 2 ile Grup 1 arasında ( $p<0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları bulunmuştur. Grup 1 ile kontrol grubu hsa-miR-373-3p ekspresyonları arasında ise istatistiksel olarak ifade farkı bulunmamıştır. hsa-miR-375 için yapılan ekspresyon karşılaştırmalarında Grup 2 ile kontrol grubu arasında ( $p<0.05$ ) ve Grup 1 ile kontrol grubu arasında ( $p<0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları bulunmuştur. Grup 1 ile Grup 2 hsa-miR-375 ekspresyonları arasında ise istatistiksel olarak ifade farkı bulunmamıştır.

#### **4.2.2. Demografik Özelliklere ve Klinik Bulgulara Göre miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması**

Çalışma gruplarının demografik özelliklerine ve klinik bulgularına göre miRNA ekspresyonları karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve hasta grupları arasındaki ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırmaları aşağıdaki grafiklerde (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5) gösterilmiştir. Tablo 4.3'de ise demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre miRNA ifade değişimlerinin p değerleri ile gösterimi bulunmaktadır.

**Tablo 4.3:** Demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre miRNA ifade seviyelerinin karşılaştırılması

Parametre/ miRNA		hsa-miR-128-3p		hsa-miR-196a-5p	
		Grup1	Grup2	Grup1	Grup2
Yaş	<60	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	60 ve üstü	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
Cinsiyet	Kadın	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Erkek	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
DM	Var	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Yok	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
HT	Var	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Yok	0.023	0.044	>0.05	>0.05
HL	Var	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Yok	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
Sigara	Var	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Yok	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
Aile öyküsü	Var	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Yok	>0.05	0.029	>0.05	>0.05

**Tablo 4.3 (devamı)**

Parametre/ miRNA		hsa-miR-375		hsa-miR-373-3p	
		Grup1	Grup2	Grup1	Grup2
Yaş	<60	>0.05	>0.05	>0.05	0.017
	60 ve üstü	0.006	0.037	0.0042	0.019
Cinsiyet	Kadın	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Erkek	>0.05	>0.05	0.031	0.007
DM	Var	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Yok	>0.05	>0.05	0.004	0.007
HT	Var	0.005	>0.05	0.017	0.017
	Yok	>0.05	>0.05	0.008	0.005
HL	Var	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Yok	>0.05	>0.05	0.009	0.005
Sigara	Var	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Yok	>0.05	0.041	0.0026	0.0002
Aile öyküsü	Var	0.023	>0.05	0.001	0.02
	Yok	0.015	>0.05	>0.05	0.013

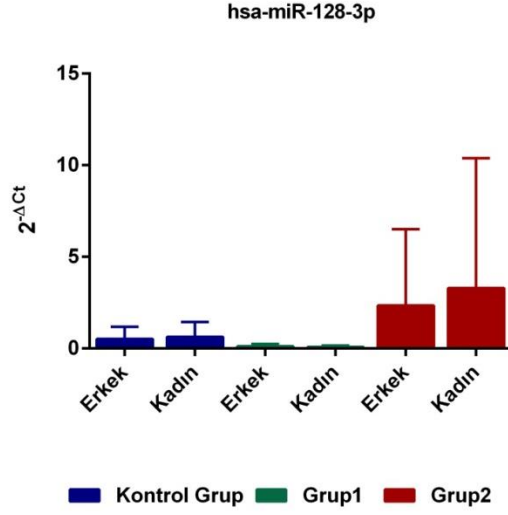
Karşılaştırmalar kontrol grubuna göre yapılmıştır.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  ve \*\*\* $p < 0.001$  değerleri kırmızı ile gösterilmiştir

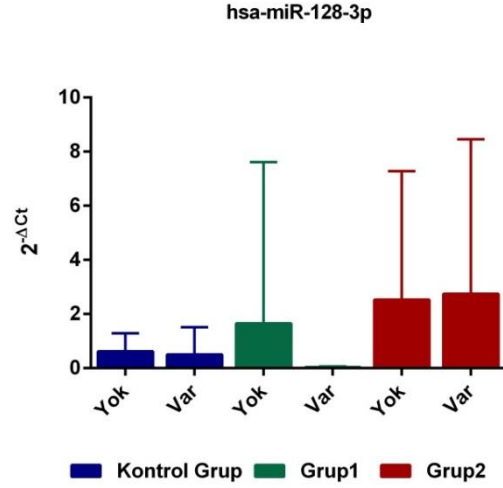
DM: Diabetes Mellitus, HT: Hipertansiyon, HL: Hiperlipidemi

**Şekil 4.2:** hsa-miR-128-3p'nin demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi

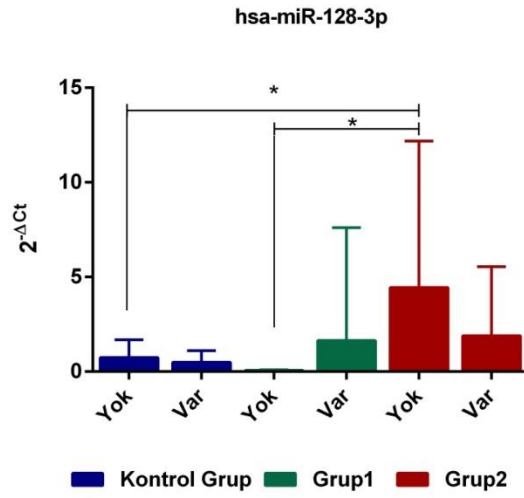
**A. Cinsiyet:**



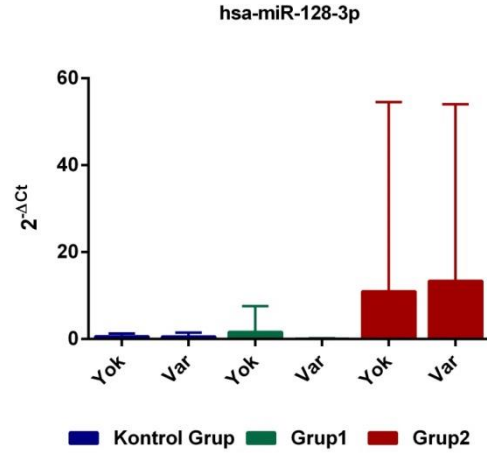
**B. Diabetes Mellitus:**



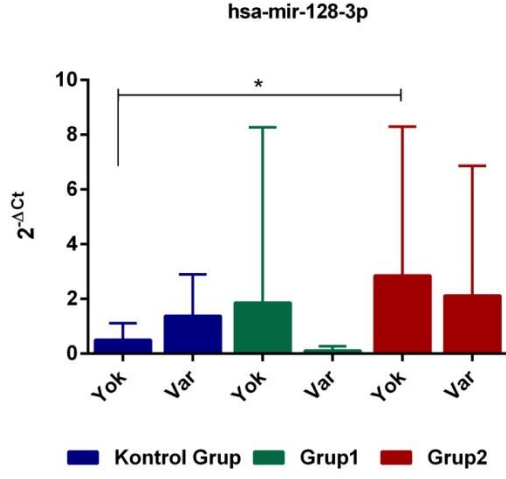
**C. Hipertansiyon:**



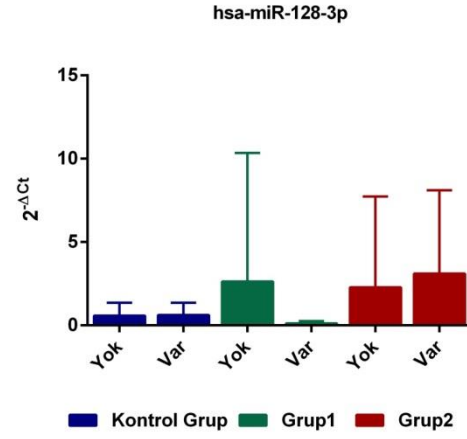
**D. Hiperlipidemi:**



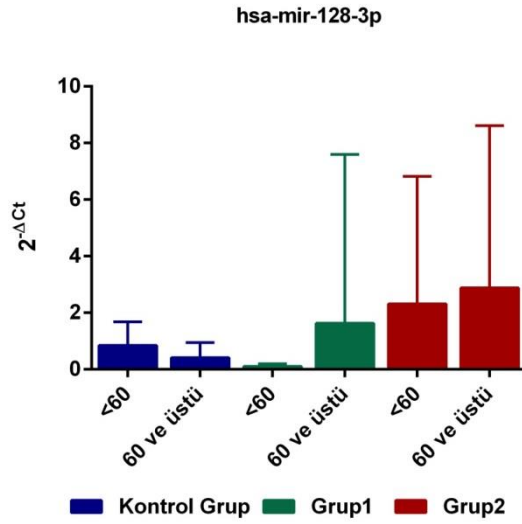
### E. Aile öyküsü:



### F. Sigara kullanımı:



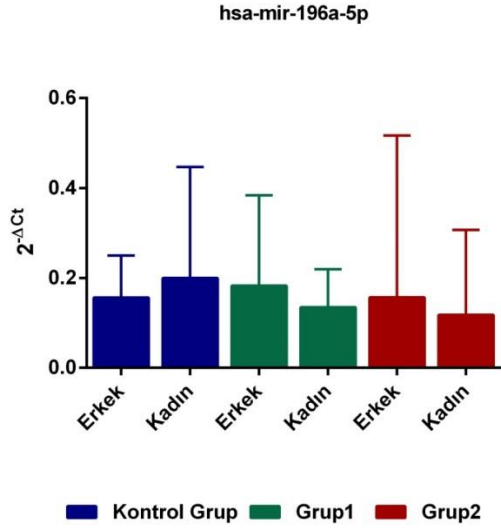
### G. Yaş:



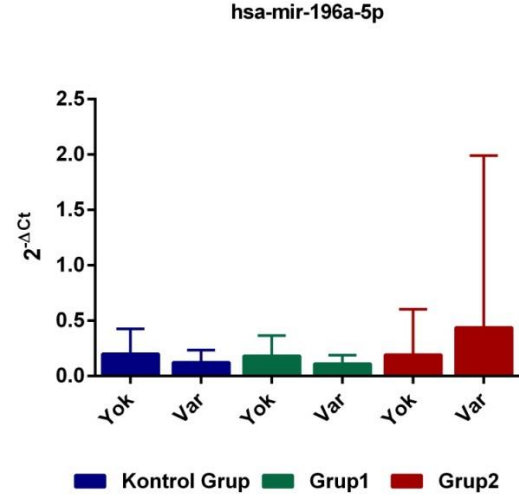
**Şekil 4.2:** hsa-miR-128-3p'nin demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi (Grafiklerde p değerleri direkt olarak yazılmayıp  $*p < 0.05$  ile belirtilmiştir)

**Şekil 4.3:** hsa-miR-196a-5p'nin demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi

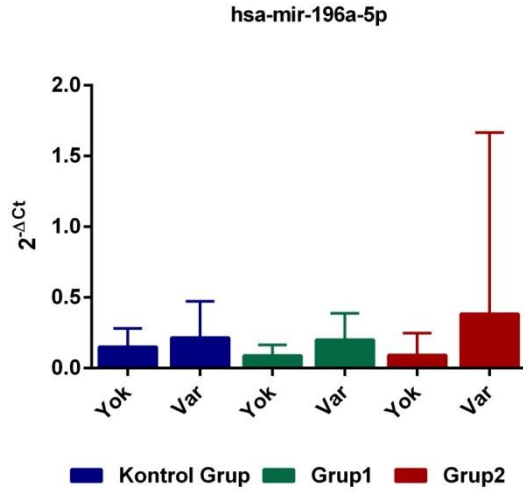
**A. Cinsiyet:**



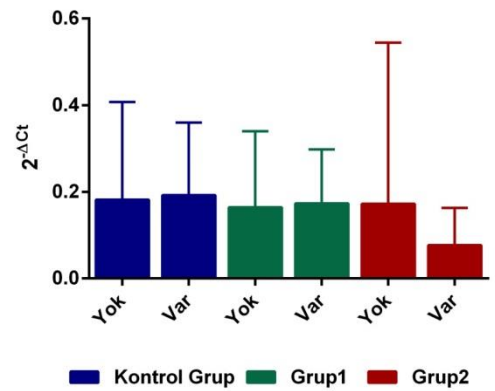
**B. Diabetes Mellitus:**



**C. Hipertansiyon:**

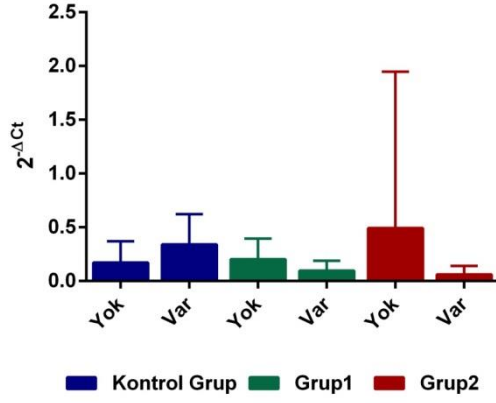


**D. Hiperlipidemi:**



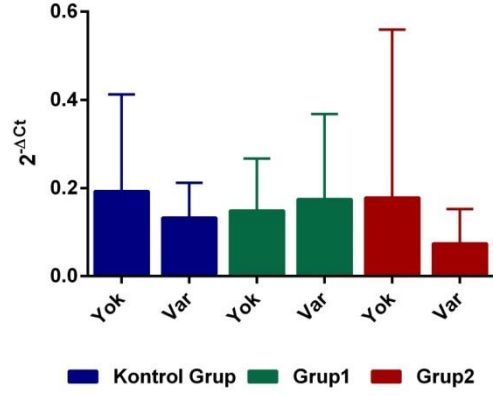
### E. Aile öyküsü:

hsa-mir-196a-5p



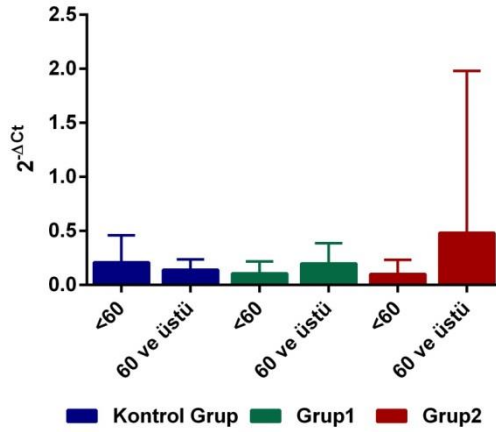
### F. Sigara kullanımı:

hsa-mir-196a-5p



### G. Yaş:

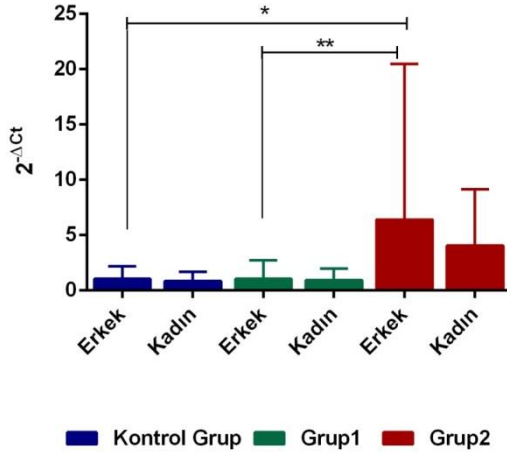
hsa-mir-196a-5p



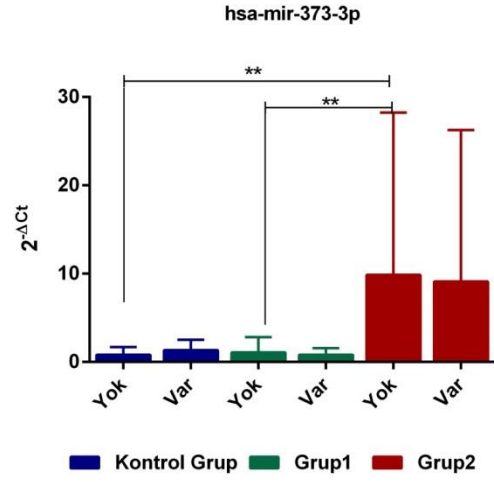
Şekil 4.3: hsa-miR-196a-5p'nin demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi

Şekil 4.4: hsa-miR-373-3p'nin demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi

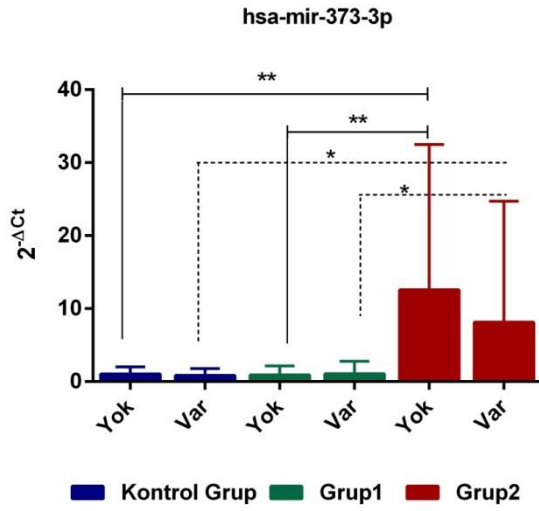
#### A. Cinsiyet:



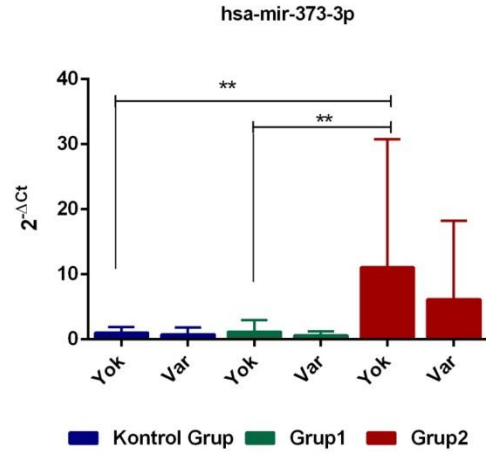
#### B. Diabetes Mellitus:



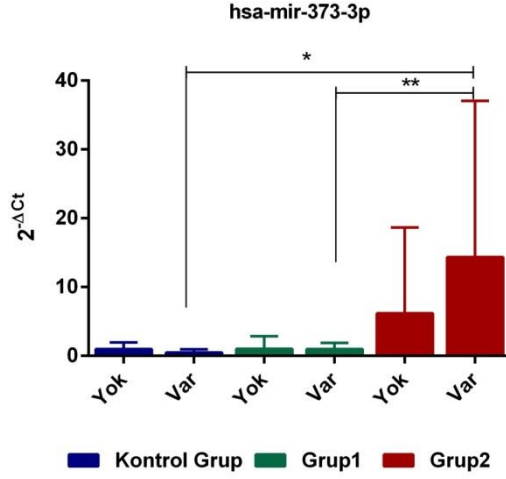
#### C. Hipertansiyon:



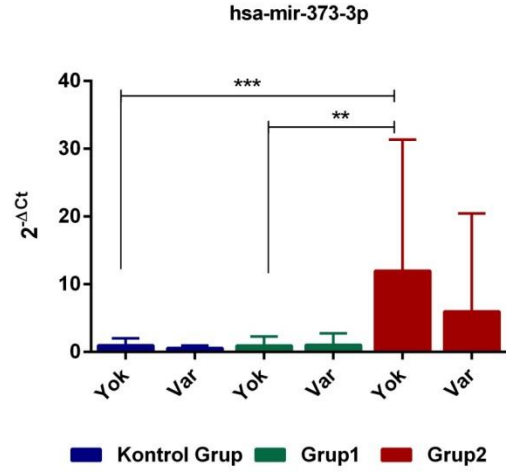
#### D. Hiperlipidemi:



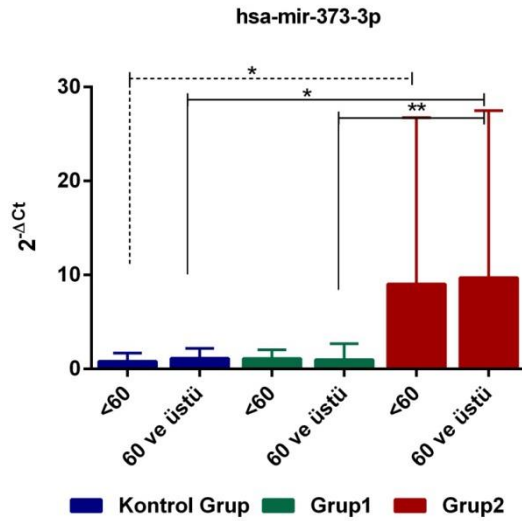
### E. Aile öyküsü:



### F. Sigara kullanımı:



### G. Yaş:



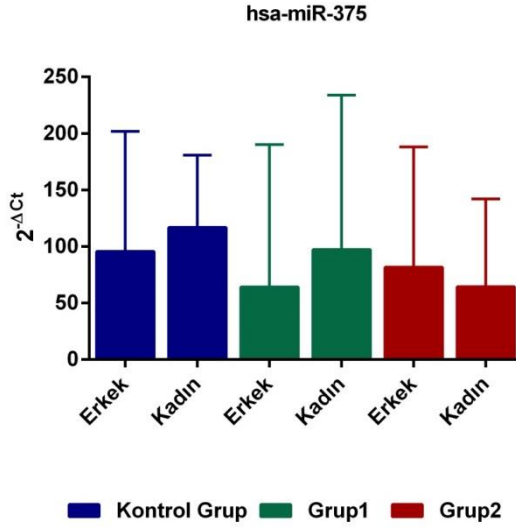
**Şekil 4.4:** hsa-miR-373-3p'nin demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi (Grafiklerde p değerleri direkt olarak yazılmayıp \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  ve \*\*\* $p<0.001$  sembolleri ile belirtilmiştir)

One-Way ANOVA testi sonuçlarına göre hsa-miR-373-3p'nin demografik özellikler ve klinik bulgulara göre çalışma grupları arasındaki ekspresyonları karşılaştırıldığında, 60 yaş üstünde olanlarda, erkek cinsiyette, hipertansiyonu olanlarda ve aile öyküsü bulunanlarda kontrol grubu ile Grup 1 arasında ve kontrol grubu ile Grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları bulunmuştur ( $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ).

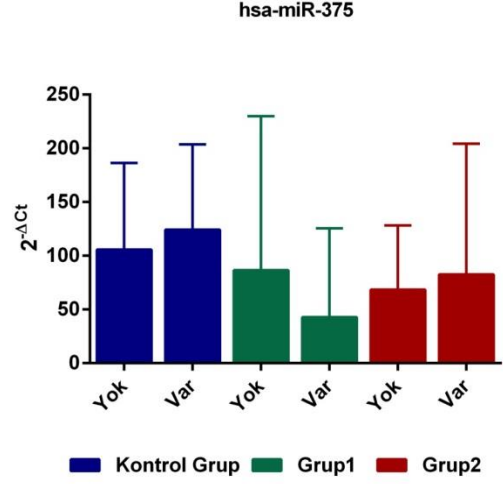


Şekil 4.5: hsa-miR-375'in demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi

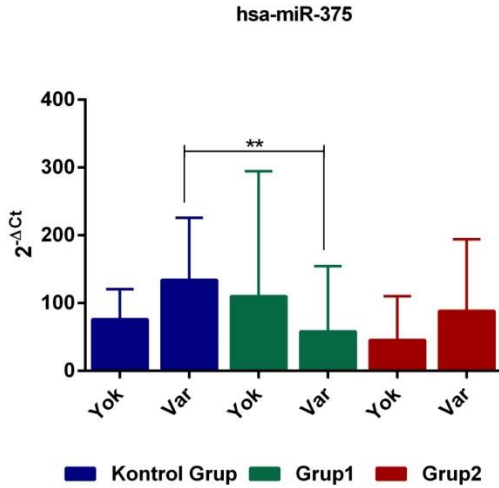
**A. Cinsiyet:**



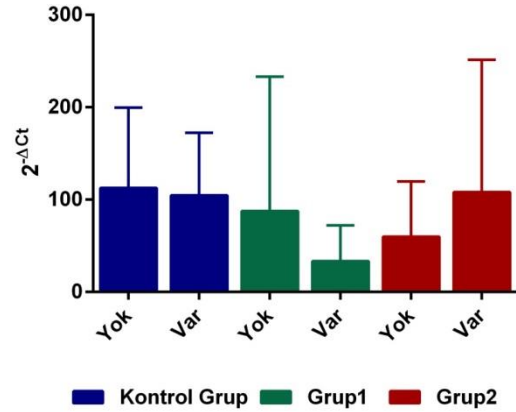
**B. Diabetes Mellitus:**



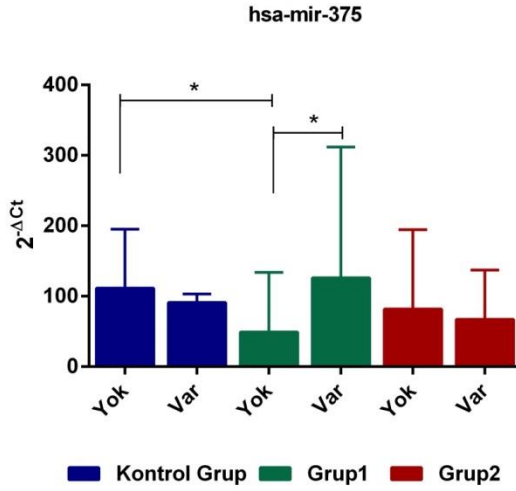
**C. Hipertansiyon:**



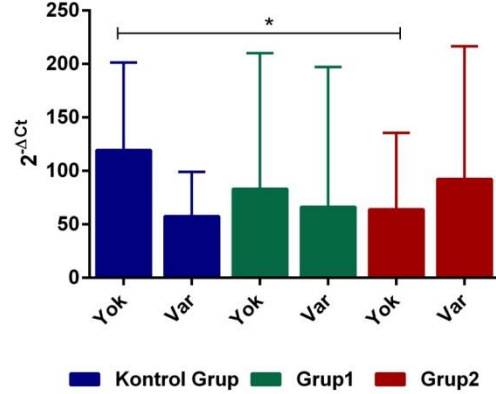
**D. Hiperlipidemi:**



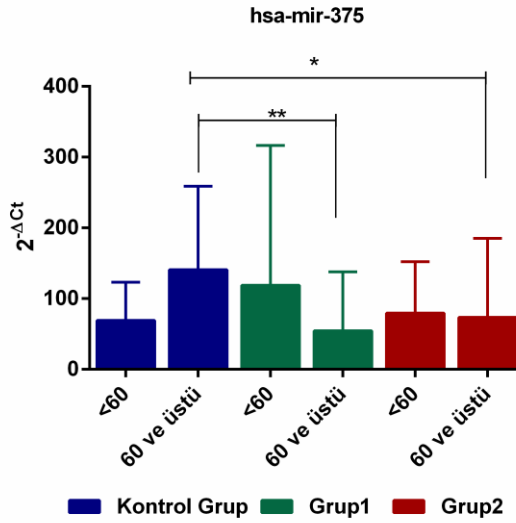
### E. Aile öyküsü:



### F. Sigara kullanımı:



### G. Yaş:



**Şekil 4.5:** hsa-miR-375'in demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre değerlendirilmesi (Grafiklerde p değerleri direkt olarak yazılmayıp \* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  sembolleri ile belirtilmiştir)

One-Way ANOVA testi sonuçlarına göre hsa-miR-375'in demografik özellikler ve klinik bulgulara göre çalışma grupları arasındaki ekspresyonları karşılaştırıldığında 60 yaş üstünde olanlarda kontrol grubu ile Grup 1 arasında ve kontrol grubu ile Grup 2 arasında ( $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ), ayrıca hipertansiyonu olanlarda kontrol grubu ile Grup 1 arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları bulunmuştur ( $p<0.01$ ).

## 5. TARTIŞMA

KVS hastalıkları tüm dünyada ve ülkemizde hastalık yükü araştırmalarında ve ölüm nedenleri istatistiklerinde birinci sırada yer almaktadır. KVS hastalıkları içerisinde de iskemik kalp hastalıkları olan KAH ve sonrasında gelişen AKS en önemli ve en büyük grubu oluşturmaktadır. KAH ve sonrasında gelişen AKS aynı zamanda tüm dünyada ölüm ve iş göremezliğin başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir (1). KVS hastalıklar nedeni ölümlerin %80'i ise düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir. Gelişmiş olan ülkelerde risk faktörlerinin ve tedavinin iyi yönetilmesine bağlı olarak KVS hastalıkları ölüm hızı azalma gösterse de toplumların yaşlanması ve beklenen yaşam süresinde görülen uzama ile gelişmiş ülkelerde de kalp ve damar hastalığı sayısı artmakta ve bunlara bağlı yük ise azalmamaktadır. (4). KAH ve AKS yönetimi giderek artan bir şekilde önemini korumaya devam etmektedir. Teknolojik gelişmelerle birlikte eş zamanlı olarak tıpta yeni yöntemlerin bulunmasıyla günümüzde farklı alanlardaki farklı yöntemler hastalıkların morbidite ve mortalitesini azaltmak amacıyla kullanılmaya devam etmektedir.

KAH ve AKS etiolojisinde geleneksel olarak bilinen risk faktörleri ve yeni tanımlanmış diğer risk faktörlerinin dışında genetik temelli nedenler de önemli bir kısmında rol oynamaktadır. Birbirinin ardı sıra gelişen KAH ve AKS durumları aralıksız bir bütündür ve patofizyolojileri heterojen ve dinamiktir. KAH gelişiminden sorumlu olan aterosklerozun patofizyolojisinde çevresel faktörler tarafından modifiye edilen ve genler tarafından kodlanan birçok enzim, reseptör, taşıyıcı, ligand, protein, belirteç ve bunların birbiri ile etkileşim içinde olduğu birçok yolak yer almaktadır. KAH; oksidatif stres, folat-homosistein metabolizması, tromboz ve fibrinolitik sistemleri üzerinde etkili olan genlerin diğer risk faktörleri ile etkileşimi ile lipid bozuklukları, endotelial disfonksiyon, arteriyel inflamasyon, kan basıncı düzensizlikleri, koagülasyon bozuklukları ve tromboz sonucunda aterosklerozun gelişimi ile oluşmaktadır (14).

KAH ve AKS tanısında ve hastalığın prognozunu öngörmede birçok biyolojik belirteç kullanılmaktadır. Bu biyobelirteçlerden en özgül ve duyarlı olanları kardiyak

hücrelerden akut MI sırasında hücre hasarı sonucunda salınan ve göğüs ağrısını takiben 4-6 saat sonra yükselen kardiyak troponinler (Troponin I veya Troponin T)'dir (20). Kardiyak troponinler AMI sonrası ilk 4-6 saat içinde artar. Bu ilk artıştan %5'lik sitoplazmik bileşen sorumludur. Miyofibrillere bağlı bileşenden troponinlerin devam eden salınımı, seviyelerin 5-10 gün yüksek seyretmesine neden olur. Kardiyak troponinler Akut MI sonrası göğüs ağrısından sonraki 6 saatlik dönemde düşük bir klinik duyarlılık (%50-65) gösterirken ağrı sonrasında geçen süre uzadıkça klinik duyarlılık %90'ların üzerine çıkmaktadır. Miyokart hasarı için ideal belirteç ise şu özellikleri taşımalıdır: Akut MI için erken tanı imkanı sağlama, risk belirlemede yardımcı olma, trombolitik tedavi sonrası reperfüzyon başarısının idaresini optimize etme, tekrarlayan oklüzyon ve tekrarlayan enfarktüsleri saptama, enfarkt boyutunu belirleme, kardiyak ve kardiyak olmayan cerrahi sırasında Akut MI'ı saptama ve 60 dakika içinde çalışılabilme (92). Böbrek yetersizliği, kalp yetersizliği, taşiaritmi veya bradikardiler, kardiyak veya kalp dışı girişimler gibi çeşitli klinik durumlarda dakardiyak hasar oluşması nedeniyle, kardiyak troponin yükselmesi ile kendini gösteren hücre ölümü ile seyreden miyokart hasarı ve kardiyak troponin seviyelerinde değişiklikler olabilmektedir (1). Öte yandan DSÖ, kaynak kısıtlılığı olmayan merkezlerde ESC ve AHA tarafından tavsiye edilen Evrensel Miyokart Enfarktüsü tanımının kullanılmasını önerirken; kaynak kısıtlılığı olan yerlerde daha esnek standartlar önermektedir. Sınırlı ekonomik kaynakları olan ülkelerde, birkaç merkez dışında, kardiyak belirteçler ve görüntüleme teknikleri mevcut olmayabilir ve EKG kaydı olanağı dahi bulunmayabilir. Bu çevrede, DSÖ, belirteç testleri veya diğer yüksek maliyetli tanı testlerinin zorunlu tanı kriteri olarak kullanılmasının uygun olmadığını belirtmiştir (93). KAH tanısında altın standart yöntem ise koroner anatomisinin görüntülenmesinde kullanılan invaziv koroner anjiyografidir. Koroner anjiyografi, tanıda, lezyonların özelliklerini belirlemede ve tedavi yöntemini belirlemede temel basamaktır. Hastalık sıklığının artması ile birlikte bu hastalıkların patolojisine yönelik ileri moleküler mekanizmalara ve yenilikçi tanı ve tedavi yaklaşımlarına olan ihtiyaç da büyümektedir (25). Gen ekspresyonunda ve regülasyonunda etkileri olduğu son yıllarda anlaşılan kısa kodlanmayan RNA'ların önemli bir üyesi olan Mikro RNA'ların dolaşımında bulunduğu tespit edilmesinden sonra özellikle de Akut MI ve kalp yetmezliğinde yeni belirteçler olarak

araştırılmaya başlanmıştır. Mikro RNA'ların kardiyak troponin gibi geleneksel belirteçlere benzer şekilde ve Akut MI sonrası prognoz belirlemede risk tahmini modellerinde değerli bir belirteç olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır. Bu alanda tanı, prognoz ve tedavi sürecinde mikro RNA'ların kullanımı ile ilgili araştırmalar devam etmektedir (24). Tüm bu bilgiler ışığında ve yeni gelişmeler doğrultusunda yeni tanı ve tedavi araçlarına olan ihtiyacın devam ettiği ve bu yöntemlerin kullanılabilirliğinin incelenmesi gerektiğini görülmektedir.

Çalışmamızda KAH ve AKS hastalarında miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenerek, bu miRNA'ların KVS hastalıkları ile olan ilişkisini incelemek amaçlandı. Bu amaca yönelik olarak hedeflenen, Adıyaman ilinde KAH veya AKS nedeniyle tanı ve tedavi için koroner anjiyografi yapılan hastalardan koroner anjiyografisi normal olan (<%50 darlık, non-obstrüktif) 45 olgu, koroner arterlerinde kritik darlık saptanıp (≥%50 darlık, obstrüktif) KAH tanısı alan 45 olgu, koroner arterlerinde tam tıkanıklık saptanıp akut MI tanısı alan 45 olgu olmak üzere toplam 135 olguya ulaşılarak miRNA ekspresyon profilleri belirlendi. Araştırmamızda analiz edilen miRNA'ların her birinin ( hsa-miR-128-3p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-373-3p ve hsa-miR-375) oluşturulan çalışma grupları arasındaki ekspresyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları gösterdikleri tespit edildi. Çalışma sonuçlarının vasküler kaynaklı patolojileri değerlendirmede ve özellikle de anjiyogenezis ile ilişkilimekanizmalara farklı bir bakış açısı getirerek KAH ve AKS olgularının yönetiminde katkıları olacağı düşünülmektedir.

Koroner anjiyografisi normal olan olgular 'Kontrol grubu', koroner arterlerinde kritik darlık saptanan olgular 'Grup 1', koroner arterlerinde tam tıkanıklık saptanan olgular 'Grup 2' olarak kabul edildikten sonra çalışma grupları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak incelendi. Demografik özelliklere ve klinik bulgulara göre çalışma grupları incelendiğinde Grup 2 ve Grup 1'de hastalığa yatkınlık oluşturan risk faktörlerinde anlamlı farklılıklar görülmektedir. Kontrol grubuna kıyasla Grup 1 ve Grup 2'de erkek cinsiyetin daha fazla olduğu görülmektedir. Yine kontrol grubuna kıyasla Grup 1 ve Grup 2'de yaş ortalamasının arttığı görülmektedir. Diabetes mellitus ile gruplar arasında da bir ilişki görülmektedir. Özellikle Grup 2'de diabetes mellitus sıklığı belirgin olarak yüksektir

( $p < 0,05$ ). Hipertansiyon ve hiperlipidemi sıklıklarının gruplar arasında benzer şekilde dağıldığı görülmektedir. Sigara kullanımı ve aile öyküsü sıklıkları ise Grup 1 ve Grup 2’de kontrol grubuna göre kıyasla belirgin olarak yüksektir ( $p < 0,05$ ).

Çalışmamızda hsa-miR-128-3p için yapılan ekspresyon karşılaştırmalarında Grup 2 ile kontrol grubu arasında ( $p < 0,05$ ) ve Grup 2 ile Grup 1 arasında ( $p < 0,01$ ) istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları bulunmuştur. Grup 1 ile kontrol grubu hsa-miR-128-3p ekspresyonları arasında ise istatistiksel olarak ifade farkı bulunmamıştır. Bu sonuçlar bize KAH olan veya daha henüz hastalık tanısı almayan bireylerde hsa-miR-128-3p’nin ifade edilmesi durumunda AKS gelişimi için uyarıcı nitelikte olabileceğini ve hsa-miR-128-3p’nin AKS gelişiminde rolü olabileceğini düşündürmektedir. hsa-miR-128-3p’nin hedef gen-miRNA ilişkisi ‘miRDB’ veri tabanında incelendiğinde aterotrombotik olaylara karşı koruyucu rolleri olduğu bilinen *KLF4* geni ile hedef puanı (target score) 73 olarak verilmektedir (94). Bu skor bize hsa-miR-128-3p’nin *KLF4*’ü hedef alarak gen ifadesi değişiklikleri ile etkili olduğu yollarda hastalıklara yatkınlık oluşturabileceği bilgisini vermektedir. Ayrıca ‘miRTarBase’ elektronik veritabanında da *KLF4* geni için hsa-miR-128-3p tarafından hedeflendiğinin deneysel olarak kanıtlanmış olduğu MIRT021926 ID’si ile gösterilmektedir (41). *KLF4* geni ve Akut MI ilişkisi, bu genin endotel hücre disfonksiyonunda oynadığı rolün gösterilmesi ile daha önceden araştırmacılar tarafından farklı miRNA ekspresyonları gösterilerek çalışılmıştır. Zhou ve ark. farelerde yaptıkları çalışmada bu genin ürünü olan endotelial kruppel-like factor 4 proteinin aterotrombotik olaylara karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir (95). Loyer ve ark. aterosklerotik farelerde *KLF4* ve diğer genlerin de rol oynadığı oksidatif stress yolağında miR-92a’nın upregüle olarak hastalığın şiddetlenmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada düşük endotel kayma geriliminin (shear stress) sonucunda damar çeperinde inflamasyonun şiddetlenmesine neden olduğuna değinilerek *KLF4* geninin de bu düzenlemede görev aldığı ve miR-92a etkisi ile inflamasyonun şiddetinin arttığı ve miR-92a’nın inhibisyonu ile endotelial hücre disfonksiyonunun giderilebileceğini bildirilmiştir (96). Fang ve Davies ise domuz aort damarlarında yaptıkları çalışmada miR-92a’nın inhibisyonu ile *KLF2* ve *KLF4* gen ekspresyonlarının arttığını ve endotelial inflamasyon göstergelerinin azaldığını ortaya koymuşlardır. miR-92a’nın arttığı durumlarda ise her iki KLF geninin

ekspresyonunun azaldığını ve aort damarlarında inflamasyonun şiddetlendiğini tespit etmişlerdir (97). Bizim çalışmamız sonucunda Akut MI grubu hastalarında belirgin olarak farklı ifade gösteren ve *KLF4* genini hedefleyen hsa-miR-128-3p'nin AKS gelişiminde rolü olabileceğini, bir biyobelirteç olarak ve bir tedavi hedefi olarak kullanılabilceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda hsa-miR-196a-5p için yapılan ekspresyon karşılaştırmalarında Grup 2 ile kontrol grubu arasında ( $p < 0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı bulunmuştur. Grup 1 ile kontrol grubu ve Grup 2 ile Grup 1 arasında hsa-miR-196a-5p ekspresyonları için istatistiksel olarak ifade farkı bulunmamıştır. Çalışma grupları arasındaki katlı değişimler (fold change) incelendiğinde ise kontrol grubundan Akut MI grubuna doğru gidildikçe downregülasyon olduğu saptanmıştır. Kontrol grubuna göre Grup 1'in katlı değişimi 0,6 iken Grup 2'nin katlı değişimi 0,3 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize hsa-miR-196a-5p'nin serum düzeyleri ile KAH şiddeti arasında ters bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. hsa-miR-196a-5p'nin hedef gen-miRNA ilişkisi 'miRDB' veri tabanında incelendiğinde endotel hücreleri kayma gerilimi yanıtında ve aterosklerozda rolleri olduğu bilinen *HOXA5* geni ile hedef puanı (target score) 92 olarak verilmektedir (94). Bu skor bize hsa-miR-196a-5p'nin *HOXA5*'i kuvvetli bir şekilde hedef olarak gen ifadesi değişiklikleri ile *HOXA5*'in etkili olduğu yollarda hastalıklara yatkınlık oluşturabileceği bilgisini vermektedir. Ayrıca 'miRTarBase' elektronik veritabanında da *HOXA5* geni için hsa-miR-196a-5p tarafından hedeflendiğinin deneysel olarak kanıtlanmış olduğu MIRT006906 ID'si ile gösterilmektedir (41). Bu genin fonksiyonları ilgili çalışmada, Dunn ve ark. farelerde *Hoxa5* transkriptlerinin endotel hücre hasarı stresi yanıtında ve aterosklerozda özellikle epigenetik düzenlemeler ile gen değişiminde rol oynadığını belirtmişlerdir (98). Chen ve Gorski ise insan hücre kültürlerinde miR-130a transfeksiyonu sonucunda antianjiyogenezis mekanizmalarında rolü olduğu bilinen *GAX* ve *HOXA5* genlerinin ekspresyonunu azaldığını göstermişlerdir. Böylece *GAX* ve *HOXA5* genlerinin antianjiyogenezis mekanizmasındaki rolleri antogonize edilerek miR-130a'nın antianjiyogenik tedavi hedefi olabileceği bildirilmiştir (99). Bizim çalışmamız sonucunda Akut MI grubu hastalarında belirgin olarak farklı ifade gösteren ve *HOXA5* genini hedefleyen hsa-miR-196a-5p'nin AKS gelişiminde rolü

olabileceğini bir biyobelirteç ve bir tedavi hedefi olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda hsa-miR-373-3p için yapılan ekspresyon karşılaştırmalarında Grup 2 ile kontrol grubu arasında ( $p<0.01$ ) ve Grup 2 ile Grup 1 arasında ( $p<0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları bulunmuştur. Grup 1 ile kontrol grubu hsa-miR-373-3p ekspresyonları arasında ise istatistiksel olarak ifade farkı bulunmamıştır. Bu sonuçlar bize KAH olan veya daha henüz hastalık tanısı almayan bireylerde hsa-miR-373-3p'nin ifade edilmesi durumunda AKS gelişimi için uyarıcı nitelikte olabileceğini ve hsa-miR-373-3p'nin AKS gelişiminde rolü olabileceğini düşündürmektedir. hsa-miR-373-3p için hedef gen-miRNA ilişkisi 'miRTarBase' elektronik veritabanında da incelendiğinde *SIRT1* geni için hsa-miR-373-3p tarafından hedeflendiğinin deneysel olarak kanıtlanmış olduğu MIRT006158 ID'si ile gösterilmektedir (41). *SIRT1* (Silent information regulator 2 homolog 1) geni 'uzun ömürlü olma geni' (longevity gene) olarak dabilinen ve kardiyovasküler sistemde birçok koruyucu özellikleri bilinen sirtuin ailesinden bir genidir. Bir çeşit deasetilaz proteini ürünü olan gen, kodladığı tip 3 protein deasetilaz aracılığıyla stres direnci, metabolizma, apoptozis ve enerji dengesini içeren birçok önemli fizyolojik olayı düzenlemektedir. Kolesterol transportunu tersine çevirerek aterosklerozis ve KVS hastalık gelişimi riskini azaltmaktadır (100). Ito ve ark. farelerde yaptıkları çalışma sonucunda endotel hücre yaşlanması ile miR-34a miktarının arttığını ve bunun *SIRT1* gen ürününün koruyucu etkisini azaltarak yaşla birlikte aterosklerozise yatkınlık oluşturduğunu bildirmişlerdir (101). Bonauer ve ark. isemiyokart enfarktüsülü ve ekstremitelerinde iskemi olan fare modellerinde yaptıkları çalışmada miR-92a'nın aşırı eksprese olduğunu ve miR-92a'yı hedef alan antogomiR uygulandıktan sonra anjiyogenezisin uyarıldığını ve yeni damarların oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Proanjiyogenik protein ürününe sahip olan *SIRT1* geninin etkinlik kazanarak anjiyogenezisin arttığını ve miR-92a'nın tedavi hedefi olduğunu belirtmişlerdir (102). Bizim çalışmamız sonucunda Akut MI grubu hastalarında belirgin olarak farklı ifade gösteren ve *SIRT1* genini hedefleyen hsa-miR-373-3p'nin AKS gelişiminde rolü olabileceğini bir biyobelirteç ve bir tedavi hedefi olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca hsa-miR-373-3p'nin demografik özellikler ve klinik bulgulara göre çalışma grupları arasındaki ekspresyonları



karşılaştırıldığında, 60 yaş üstünde olanlarda, erkek cinsiyette, hipertansiyonu olanlarda ve aile öyküsü bulunanlarda kontrol grubuna göre KAH ve AKS hasta gruplarının tümünde istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları görülmektedir ( $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ). Bu ifade farklılıkları hsa-miR-373-3p'nin risk faktörleri ile ilgili mekanizmalar ile de ilişkili olabileceği bilgisini vermektedir.

Çalışmamızda hsa-miR-375 için yapılan ekspresyon karşılaştırmalarında Grup 2 ile kontrol grubu arasında ( $p<0.05$ ) ve Grup 1 ile kontrol grubu arasında ( $p<0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları bulunmuştur. Grup 1 ile Grup 2 hsa-miR-375 ekspresyonları arasında ise istatistiksel olarak ifade farkı bulunmamıştır. Bu sonuçlar bize hastalık tanısı almayan bireylerde hsa-miR-375'in ifade edilmesi durumunda KAH veya AKS gelişimi için uyarıcı nitelikte olabileceğini ve hsa-miR-375'in KAH ve AKS gelişiminde rolü olabileceğini düşündürmektedir. hsa-miR-375 için hedef gen-miRNA ilişkisi 'miRTarBase' elektronik veritabanında da incelendiğinde *PTPNI* geni için hsa-miR-375 tarafından hedeflendiğinin deneysel olarak kanıtlanmış olduğu MIRT00545580 ID'si ile gösterilmektedir (41). *PTPNI* geninin ürünü olan PTP1b aracılığıyla *VEGFA* geni ürünleri üzerindeki kısıtlayıcı etkisi bulunduğu ve antianjiyogenik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (103). Garikipati ve ark. farelerde yaptıkları çalışmada miyokart enfarktüsü sonrasında miR-375'in downregülasyonu ile miyokart hasarının giderildiğini ve miyokart fonksiyonlarında artış görüldüğünü bildirmişlerdir (104). Zhu ve ark. gebe kadınların serumlarından yaptıkları çalışmalarında konjenital kalp defekti olan bebeklerin tayininde miR-375'in bir biyobelirteç olabileceğini bildirmişlerdir (105). Bizim çalışmamız sonucunda kontrol grubuna göre KAH ve AKS hastalarında belirgin olarak farklı ifadeler gösteren ve *PTPNI* genini hedefleyen hsa-miR-375'in AKS gelişiminde rolü olabileceğini düşündürmektedir. hsa-miR-375'in biyobelirteç olarak kullanılabilmesini ve tedavi çalışmalarında hedef olarak alınabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca hsa-miR-375'in demografik özellikler ve klinik bulgulara göre çalışma grupları arasındaki ekspresyonları karşılaştırıldığında 60 yaş üstünde olanlarda kontrol grubuna göre KAH ve AKS hasta gruplarının tümünde ( $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ), hipertansiyonu olanlarda ise Grup 1 ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılıkları görülmektedir ( $p<0.01$ ). Bu ifade farklılıkları hsa-

miR-375'in risk faktörleri ile ilgili mekanizmalar ile de ilişkili olabileceği bilgisini vermektedir.

Hipertansiyon ve miRNA profilinin anjiyogenezis üzerindeki etkilerini çalışan araştırmacılardan Fernandes ve ark. hipertansif farelerde miRNA-16 ve miRNA-21'in egzersiz sırasında arttığını hedefledikleri VEGF ve Bcl-2 aktivitelerinde azalma olduğunu gözlemlenmiştir. Ayrıca miRNA-126 ekspresyonunun azalarak hedeflediği *PI3KR2* aktivitesinin arttığı, sonuçta bu miRNA'ların hipertansif durumda kapiller sayısında azalma ve antianjiyogenik etkileri olduklarını bildirmişlerdir (106). Hipertansiyon ve anjiyogenezis ilişkisinde rolleri iyi bilinen diğer miRNA'lar miR-92a ve miR-126'dır. miR-92a endotel fonksiyonunun düzenlenmesinde özellikle *eNOS* üzerinden görev alırken, miR-126 ise VCAM-1 ve *PI3KR2* üzerinden proanjiyogenik roller üstlenmektedir (107). Bizim çalışmamızda hipertansif hasta gruplarında kontrol grubuna göre ifade farklılıkları bulduğumuz hsa-miR-373-3p ve hsa-miR-375'in KAH ve AKS olgularında anjiyogenezis üzerinden etkileri ile tedavi hedefi olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda gruplar arasında bulunan ekspresyon farklılıklarının KAH ve AKS etiopatogenezini açıklamaya yönelik yardımcı olabileceğini ve yeni tedavi hedeflerinde yol gösterebileceğini düşünmekteyiz. Kardiyak dokunun Akut MI sonrası yeniden işlev kazanabilmesi için yeterli miktarda dolaşım desteğine ihtiyacı bulunmaktadır. Yeni damarların oluşması ve kan akımı ile gerekli besin ve oksijen desteğinin sağlanması açısından anjiyogenezisin çok kritik bir öneme sahip olduğu bilinmektedir. Anjiyogenezisi etkileyen birkaç miRNA tanımlanmış fakat bunların çoğu kalp üzerinde çalışılmadığı bildirilmiştir (77). Bugüne kadar yapılan birçok çalışma ile miRNA tarafından düzenlenen hücresel olayların stres ve hasarlanma durumunda yetersiz veya aşırı şekilde gerçekleşmesi şeklinde olduğunun görülmesi miRNA'ların hastalıkların oluşumundaki asıl rolünün anlaşılmasını sağlamıştır (108). Zaman geçtikçe miRNA'ların insan hastalıklarında nasıl bir rol üstlendiği konusu daha da merak uyandırmış ve bu sorulara yanıt aramaya yönelik birçok çalışma yürütülmüştür, gelişimini tamamlamış dokuların fizyolojik ve patofizyolojik

strese verdiği cevabın miRNA'lar tarafından son derece etkilendikleri ortaya çıkarılmıştır (109).

Günümüzde miRNA-hedef gen çalışmaları ve bu çalışmalar sonucunda biyobelirteç ve tedavi araştırmaları tüm hızıyla devam ederken kompleks etkileşimler, miRNA'ların kendi doğal özelliklerinden dolayı izlenecek yöntemlerin karmaşıklığı ve hedeflerin çok çeşitlilik göstermesi gibi nedenler miRNA araştırmalarındaki zorlukların başlıcaları olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin; bir miRNA hedef dizilerin özelliklerine göre birçok genin ifadesini etkileyebilmekte, yüzden fazla transkriptin ekspresyonunu düzenleyebilmektedir. Buna karşılık olarak bir tek gen de eğer transkribe olduğu mRNA üzerinde birçok miRNA'ya uygun komplementer dizi bulunuyorsa farklı miRNA'lar tarafından regüle edilebilmektedir (47). Ayrıca hedef dizi uyumluluğuna ve komplementer dizinin bağlanma bölgelerindeki noktalara göre de her bir miRNA'nın etkinliği değişebilmektedir. Bunun yanında herhangi bir miRNA ekspresyonu ile mi hastalıkların ortaya çıktığı, yoksa hastalık durumdan dolayı mı miRNA'ların eksprese edildiği ayrı bir dilemma olarak karşımıza çıkmaktadır. İlave olarak miRNA ekspresyonu ve işlevlerini düzenleyen diğer genlerde görülebilen mutasyonlar da bu hastalıklara yol açabilmektedir. Dahası miRNA fonksiyonlarını kontrol eden ve miRNA'ları baskılayan diğer kodlanmayan RNA'ların (circRNA) varlığının da bu hastalıkların gelişmesinde rol oynayabileceği bilinmektedir (110). Tüm bu nedenleri tam olarak anlayabilmenin en iyi yolunun deneysel çalışmalar ile hedeflenen miRNA'ların ve etkilerinin çalışılıp gösterilmesinden geçtiği açıktır.

Biyobelirteç araştırmalarında günümüz teknolojileri ile serum ve plazma örneklerinden özellikle kanser alanında minimal invaziv tanı (liquid biopsy) alışmaları yapılabilmektedir. Bu sayede gereksiz biyopsilerden kaçınılarak eksozomal ve dolaşımdaki serbest belirteçler büyük bir özgüllük ve etkinlik ile tespit edilebilmektedir (111). miRNA araştırmalarının da bezer şekillerde bu alanda gelecekte büyük önem teşkil edeceği öngörülmektedir.

Çalışmamızın çok önemli sonuçlarının yanında bazı kısıtlılıkları da bulunmaktadır. Birincisi, alışmamızda kontrol grubu, koroner anjiyografi uygulanıp koroner arterlerinde kalp fonksiyonlarını etkilemeyecek düzeyde (<50%) darlık

bulunan veya hiç darlık bulunmayan hastalardan oluşmaktadır. Bu tercihin nedeni koroner arterlerde tıkanıklık ve anjiyogenezis üzerinde daha etkin bir şekilde araştırma yapabilmektir. Fakat tamamen sağlıklı gönüllülerden oluşan bir kontrol grubu oluşturularak da hedef miRNA'ların ekspresyonunda bir farklılık olup olmadığı araştırılmalıdır. İkincisi, çalışmamızda housekeeping gen olarak seçilen *RNU6-6P* geninin serum örneklerinde eksprese olmadığı tespit edilmiştir. Bunun yerine Mestdag ve ark. tarafından qRT-PCR miRNA ekspresyon çalışmaları için geliştirilen ortalama ekspresyon üzerinden normalizasyon metodu kullanılmıştır (91). Tekrarlayan çalışmalarda serumda eksprese olduğu bilinen başka housekeeping genler (*SNORD61* gibi) kullanılarak normalizasyonun çalışma esnasında birlikte yapılması daha faydalı olacaktır. Bir diğer önemli konu, bulunan bu ekspresyon farklılıklarının KAH ve AKS olgularında bilinen en iyi biyobelirteç olan kardiyak troponinler ile karşılaştırılarak etkinlikleri hakkında çıkarımlarda bulunulmalıdır. Son olarak bulunan bu ekspresyon farklılıklarının hedef gen ve ürünlerinde özellikle de protein ekspresyonu düzeyinde konfirme edilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda hedeflediğimiz gibi KAH ve AKS olgularında belirgin ifade farklılıkları olan miRNA'ları göstermiş olduk. Hasta gruplarında farklı ekspresyon düzeylerini saptadığımız miRNA'ların KAH ve AKS gelişiminde rolleri olduğunu ve ayrıca bu hastalıklar için bir biyobelirteç ve tedavi hedefi olabileceğini düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇLAR

Koroner Arter Hastalığı ve Akut Koroner Sendrom gelişiminde rol oynayan mikro RNA'ları araştırdığımız bu çalışmamızda;

1. hsa-miR-128-3p için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda koroner arterlerinde tam tıkanıklık olan hasta grubu ile koroner arterlerinde darlık olmayan grup arasında ( $p<0.05$ ) ve koroner arterlerinde tam tıkanıklık olan hasta grubu ile koroner arterlerinde kritik darlık olan hasta grupları arasında ( $p<0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı miRNA ifade farklılıkları bulunmuştur.
2. hsa-miR-196a-5p için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda koroner arterlerinde tam tıkanıklık olan hasta grubu ile koroner arterlerinde darlık olmayan grup arasında ( $p<0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı miRNA ifade farklılığı bulunmuştur.
3. hsa-miR-373-3p için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda koroner arterlerinde tam tıkanıklık olan hasta grubu ile koroner arterlerinde darlık olmayan grup arasında ( $p<0.01$ ) ve koroner arterlerinde tam tıkanıklık olan hasta grubu ile koroner arterlerinde kritik darlık olan hasta grupları arasında ( $p<0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı miRNA ifade farklılıkları bulunmuştur.
4. hsa-miR-373-3p için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda 60 yaş üstünde olanlarda, erkek cinsiyette, hipertansiyonu olanlarda ve aile öyküsü bulunanlarda koroner arterlerinde darlık olmayan gruba göre koroner arterlerinde tam tıkanıklık olan hasta grubu ve koroner arterlerinde kritik darlık olan hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı miRNA ifade farklılıkları bulunmuştur ( $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ).
5. hsa-miR-375 için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda koroner arterlerinde tam tıkanıklık olan hasta grubu ile koroner arterlerinde darlık olmayan grup arasında ( $p<0.05$ ) ve koroner arterlerinde kritik darlık olan hasta grubu ile koroner arterlerinde darlık olmayan grup arasında ( $p<0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı miRNA ifade farklılıkları bulunmuştur.
6. hsa-miR-375 için yapılan ekspresyon çalışmaları sonucunda 60 yaş üstünde olanlarda koroner arterlerinde darlık olmayan gruba göre koroner arterlerinde

tam tıkanıklık olan hasta grubu ve koroner arterlerinde kritik darlık olan hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı miRNA ifade farklılıkları görülmektedir ( $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ). Hipertansiyonu olanlarda da koroner arterlerinde darlık olmayan gruba göre koroner arterlerinde kritik darlık olan hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı miRNA ifade farklılığı bulunmuştur ( $p<0.01$ ).

Sonuçları anlamlı ifade farklılıkları sunan bu miRNA ekspresyon çalışmasının daha anlamlı olabilmesi için daha büyük kontrol ve hasta grupları ile tekrarı gösterilmeli, ayrıca mRNA ve protein düzeyinde de çalışmalar yapılmalıdır. Hedef gen-miRNA ilişkisinden yola çıkarak Koroner Arter Hastalığı ve Akut Koroner Sendrom için biyobelirteç ve tedavi hedefi olarak kullanılabilme olanakları araştırılmalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Steg, P.G., et al., ST-segment Yükselmeli Akut Miyokart Enfarktüsü ile Başvuran Hastaların Tedavisine İlişkin ESC Kılavuzu. Türk Kardiyol Dern Arş 2013. Suppl. 3.
2. Bax, J.J., et al., ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. Turk Kardiyol Dern Ars, 2011. 39(3): p. 73-128.
3. Global Health Estimates: Deaths, disability-adjusted life year (DALYs), years of life lost (YLL) and years lost due to disability (YLD) by cause, age and sex, 2000–2012. Geneva: World Health Organization. Available online:[http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/).
4. Yusuf, S., et al., Cardiovascular risk and events in 17 low-, middle-, and high-income countries. New England Journal of Medicine, 2014. 371(9): p. 818-827.
5. Mozaffarian, D., et al., Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update A Report From the American Heart Association. Circulation, 2016. 133: p. e38-e360
6. Onat, A., TEKHARF 2015 Yetişkinlerimizin Sağlığı ve Kronik Hastalıklara Tıbbın Yaklaşımına Öncülük. 2015, İstanbul: Logos Yayıncılık.
7. Türkiye İstatistik Kurumu 2015 verileri. TÜİK Ölüm Nedeni İstatistikleri. 2016.
8. Ulusal Hastalık Yüğü Çalışması 2013 Ön Sunumu 6 Aralık 2016 [http://www.hips.hacettepe.edu.tr/UHYCSunumu\\_06122016.pdf](http://www.hips.hacettepe.edu.tr/UHYCSunumu_06122016.pdf).
9. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye Kronik Hastalıklar ve Risk Faktörleri Sıklığı Çalışması 2011 2013, Ankara. 191.
10. World Health Organization. The Atlas of Heart Disease and Stroke. 2004. [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/cvd\\_atlas\\_03\\_risk\\_factors.pdf](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_03_risk_factors.pdf).
11. Türkiye Kalp ve Damar Hastalıkları Önleme ve Kontrol Programı Eylem Planı (2015-2020). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2015. Ankara.

12. Chow, C.K., et al., Parental History and Myocardial Infarction Risk Across the World. 2011, Journal of the American College of Cardiology.
13. Nussbaum, R.L., R.R. McInnes, and H.F. Willard, Thompson & Thompson genetics in medicine. 2015: Elsevier Health Sciences. 204, 226-230.
14. Sılan, F. and Ö. Özdemir, Kardiyovasküler Sistem Hastalıklarına Genetik Yaklaşım. Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları, ed. M. Dundar. Vol. 2. 2016. 935-954.
15. Elektronik veritabanı: <http://www.genecards.org/> (Ocak 2017).
16. Elektronik veritabanı: <http://www.ensembl.org>. (Ocak 2017)
17. Dandona, S., et al., Gene dosage of the common variant 9p21 predicts severity of coronary artery disease. Journal of the American College of Cardiology, 2010. 56(6): p. 479-486.
18. van Rooij, E., The art of microRNA research. Circ Res, 2011. 108(2): p. 219-34.
19. Wang, S., et al., The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. Dev Cell, 2008. 15(2): p. 261-71.
20. Chan, D. and L.L. Ng, Biomarkers in acute myocardial infarction. BMC Medicine, 2010. 8(1): p. 34.
21. Alpert, J.S., et al., Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol, 2000. 36(3): p. 959-69.
22. Bodor, G.S., et al., Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. Clinical Chemistry, 1995. 41(12): p. 1710-1715.
23. Mayer, M., Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. Clinical chemistry, 2000. 46(11): p. 1723-1727.
24. Romaine, S.P., et al., MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. Heart, 2015. 101(12): p. 921-928.
25. Arunachalam, G., et al., MicroRNA signature and cardiovascular dysfunction. Journal of cardiovascular pharmacology, 2015. 65(5): p. 419-429.



26. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993. 75(5): p. 843-854.
27. Reinhart, B.J., et al., The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 2000. 403(6772): p. 901-906.
28. Bartel, D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 2004. 116(2): p. 281-297.
29. Ruvkun, G., Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, 2001. 294(5543): p. 797-799.
30. Fire, A., et al., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 1998. 391(6669): p. 806-811.
31. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 20 Mar 2017. <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2006/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/)>.
32. Couzin, J., Small RNAs make big splash. 2002, American Association for the Advancement of Science.
33. Calin, G.A., et al., Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. 99(24): p. 15524-15529.
34. Artan, S., Epigenetik. *Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları*, ed. M. Dundar. Vol. 1. 2016. 178-221.
35. Djebali, S., et al., Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 2012. 489(7414): p. 101-108.
36. Güzelgül, F. and K. Aksoy, Bir Gen İfade Düzenleyicisi miRNA. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2015. 24(4): p. 472-493.
37. Buckingham, S., The major world of microRNAs. *Nature*, 2003. 4.
38. Bentwich, I., et al., Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics*, 2005. 37(7): p. 766-770.
39. Elektronik veritabanı: 'miRBase: the microRNA database' <http://www.mirbase.org/index.shtml> (Mart 2017). .

40. Elektronik veritabanı: DIANA-TarBase v7.0 <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index/> (Mart 2017).
41. Elektronik veritabanı: miRTarBase <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php> (Mart 2017).
42. Bissels, U., A. Bosio, and W. Wagner, MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica*, 2012. 97(2): p. 160-167.
43. Großhans, H. Regulation of microRNAs. 2010: Springer-Verlag New York.
44. Kapinas, K. and A.M. Delany, MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis research & therapy*, 2011. 13(3): p. 220.
45. Wienholds, E. and R.H. Plasterk, MicroRNA function in animal development. *FEBS letters*, 2005. 579(26): p. 5911-5922.
46. Melman, Y.F., R. Shah, and S. Das, MicroRNAs in Heart Failure. *Circulation: Heart Failure*, 2014. 7(1): p. 203-214.
47. Bauersachs, J. and T. Thum, Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs. *Circulation Research*, 2011. 109(3): p. 334-347.
48. Esteller, M., Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 2011. 12(12): p. 861-874.
49. Goodall, E.F., et al., Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. 2013.
50. Li, Y.Y., et al., miRNA-155 up-regulation and complement factor H (CFH) deficits in Down's Syndrome. *Neuroreport*, 2012. 23(3): p. 168.
51. M Ardekani, A. and M. Moslemi Naeini, The role of microRNAs in human diseases. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 2011. 2(4): p. 161-180.
52. Lawrie, C.H., et al., Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology*, 2008. 141(5): p. 672-675.
53. Mitchell, P.S., et al., Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(30): p. 10513-10518.
54. Weber, J.A., et al., The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*, 2010. 56(11): p. 1733-1741.

55. Thind, A. and C. Wilson, Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2016. 5.
56. Vosa, U., et al., Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer. *International journal of cancer*, 2013. 132(12): p. 2884-2893.
57. Calura, E., et al., miRNA landscape in stage I epithelial ovarian cancer defines the histotype specificities. *Clinical Cancer Research*, 2013. 19(15): p. 4114-4123.
58. Eichelsler, C., et al., Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. *Oncotarget*, 2014. 5(20): p. 9650-63.
59. Zhou, W., et al., Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer cell*, 2014. 25(4): p. 501-515.
60. Que, R., et al., Analysis of serum exosomal microRNAs and clinicopathologic features of patients with pancreatic adenocarcinoma. *World journal of surgical oncology*, 2013. 11(1): p. 219.
61. Mahdian-shakib, A., et al., Differential role of microRNAs in prognosis, diagnosis, and therapy of ovarian cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016. 84: p. 592-600.
62. Bovy, N., et al., Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer. *Oncotarget*, 2015.
63. Chen, X., et al., MiRNAs-mediated cisplatin resistance in breast cancer. *Tumor Biology*, 2016. 37(10): p. 12905-12913.
64. Corcoran, C., et al., Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer. *Clinical chemistry*, 2011. 57(1): p. 18-32.
65. van Rooij, E., A.L. Purcell, and A.A. Levin, Developing microRNA therapeutics. *Circulation research*, 2012. 110(3): p. 496-507.
66. Broderick, J.A. and P.D. Zamore, MicroRNA therapeutics. *Gene therapy*, 2011. 18(12): p. 1104-1110.
67. Krützfeldt, J., et al., Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 2005. 438(7068): p. 685-689.

68. Xiao, J., et al., Retracted: Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: Examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4. *Journal of cellular physiology*, 2007. 212(2): p. 285-292.
69. Janssen, H.L., et al., Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *New England Journal of Medicine*, 2013. 368(18): p. 1685-1694.
70. Elektronik veritabanı: Clinical Trials <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01829971> (Mart 2017).
71. Thum, T., et al., MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*, 2007. 116(3): p. 258-67.
72. Tijssen, A.J., Y.M. Pinto, and E.E. Creemers, Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2012. 303(9): p. H1085-H1095.
73. Small, E.M. and E.N. Olson, Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*, 2011. 469(7330): p. 336-342.
74. Wahlquist, C., et al., Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart. *Nature*, 2014. 508(7497): p. 531-535.
75. Montgomery, R.L., et al., Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation*, 2011: p. CIRCULATIONAHA.111.030932.
76. Rayner, K.J., et al., Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*, 2011. 121(7): p. 2921-2931.
77. Boon, R.A. and S. Dimmeler, MicroRNAs in myocardial infarction. *Nature Reviews Cardiology*, 2015. 12(3): p. 135-142.
78. Gu, H., Z. Liu, and L. Zhou, Roles of miR-17-92 Cluster in Cardiovascular Development and Common Diseases. *BioMed Research International*, 2017. 2017.
79. Devaux, Y., et al., Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain. *Journal of internal medicine*, 2015. 277(2): p. 260-271.

80. Wang, G.-K., et al., Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *European heart journal*, 2010. 31(6): p. 659-666.
81. Widera, C., et al., Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2011. 51(5): p. 872-875.
82. Zampetaki, A., et al., Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 2012. 60(4): p. 290-299.
83. Fichtlscherer, S., et al., Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease: novelty and significance. *Circulation research*, 2010. 107(5): p. 677-684.
84. Hu, S., et al., MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation*, 2010. 122(11 suppl 1): p. S124-S131.
85. Ghosh, G., et al., Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- $\alpha$  isoforms and promotes angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 2010. 120(11): p. 4141-4154.
86. Hulsmans, M. and P. Holvoet, MicroRNAs as early biomarkers in obesity and related metabolic and cardiovascular diseases. *Current pharmaceutical design*, 2013. 19(32): p. 5704-5717.
87. Pritchard, C.C., H.H. Cheng, and M. Tewari, MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics*, 2012. 13(5): p. 358-369.
88. Benes, V. and M. Castoldi, Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*, 2010. 50(4): p. 244-249.
89. Kubista, M., et al., The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 2006. 27(2): p. 95-125.
90. QIAGEN, miScript PCR System Handbook 2011. 11.
91. Mestdagh, P., et al., A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome biology*, 2009. 10(6): p. R64.

92. Burtis, C.A. and E.R. Ashwood, Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. Kardiyak fonksiyon, ed. F.S. Apple. 2005: Palme Yayıncılık. 682-697.
93. Mendis, S., et al., Writing group on behalf of the participating experts of the WHO consultation for revision of WHO definition of myocardial infarction. World Health Organization definition of myocardial infarction, 2008. 9: p. 139-146.
94. Elektronik veritabanı: 'miRDB':<http://mirdb.org/miRDB/index.html> (Mart 2017).
95. Zhou, G., et al., Endothelial Kruppel-like factor 4 protects against atherothrombosis in mice. The Journal of clinical investigation, 2012. 122(12): p. 4727-4731.
96. Loyer, X., et al., Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice. Circulation research, 2013: p. CIRCRESAHA. 113.302213.
97. Fang, Y. and P.F. Davies, Site-specific microRNA-92a regulation of Krüppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2012. 32(4): p. 979-987.
98. Dunn, J., et al., The role of epigenetics in the endothelial cell shear stress response and atherosclerosis. The international journal of biochemistry & cell biology, 2015. 67: p. 167-176.
99. Chen, Y. and D.H. Gorski, Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. Blood, 2008. 111(3): p. 1217-1226.
100. Ma, L. and Y. Li, SIRT1: Role in cardiovascular biology. Clinica Chimica Acta, 2015. 440: p. 8-15.
101. Ito, T., S. Yagi, and M. Yamakuchi, MicroRNA-34a regulation of endothelial senescence. Biochemical and biophysical research communications, 2010. 398(4): p. 735-740.
102. Bonauer, A., et al., MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. Science, 2009. 324(5935): p. 1710-1713.

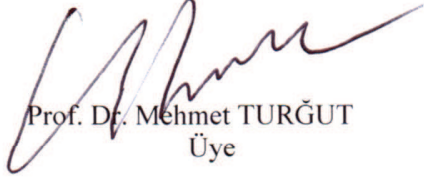
103. Lanahan, A.A., et al., Ptp1b is a physiologic regulator of vegf signaling in endothelial cells. *Circulation*, 2014: p. CIRCULATIONAHA. 114.009683.
104. Garikipati, V.N.S., et al., Negative Regulation of miR-375 by Interleukin-10 Enhances Bone Marrow-Derived Progenitor Cell-Mediated Myocardial Repair and Function After Myocardial Infarction. *Stem Cells*, 2015. 33(12): p. 3519-3529.
105. Zhu, S., et al., Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects. *Clinica Chimica Acta*, 2013. 424: p. 66-72.
106. Fernandes, T., et al., Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors. *Hypertension*, 2012. 59(2): p. 513-520.
107. Bonauer, A., R. A Boon, and S. Dimmeler, Vascular micrnas. *Current drug targets*, 2010. 11(8): p. 943-949.
108. Mendell, J.T. and E.N. Olson, MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*, 2012. 148(6): p. 1172-1187.
109. Leung, A.K. and P.A. Sharp, MicroRNA functions in stress responses. *Molecular cell*, 2010. 40(2): p. 205-215.
110. Panda, A.C., et al., Emerging roles and context of circular RNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2017. 8(2).
111. Webb, S., *The cancer bloodhounds*. 2016, Nature Research.

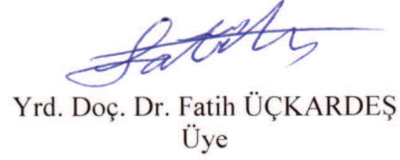
T.C.  
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Tıp Fakültesi Dekanlığı  
Biyomedikal Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
27/10/2015	7	2015/07-8

Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Haydar BAĞIŞ'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan“Adıyaman İlinde Akut Koroner Sendrom Olgularında mi-RNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi” adlı proje için hazırlanmış olan ve 22/10/2015 tarihinde sunulan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Başvuru Formu ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürürlükte olan ilgili yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve Etik Kurul kararının başvuru sahibine iletilmesine toplantıya katılan Etik Kurul Üyeleri'nin oy birliği ile karar verilmiştir.

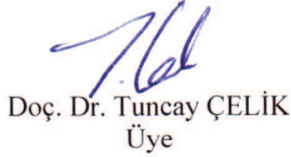
(Proje Araştırmacısı)  
Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ  
Başkan

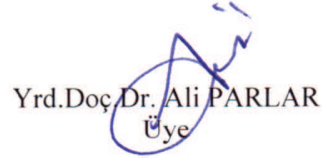
  
Prof. Dr. Mehmet TURĞUT  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Fatih ÜÇKARDEŞ  
Üye

**(İzinli)**  
Doç. Dr. Musa ABEŞ  
Üye

**(Katılmadı)**  
Yrd. Doç. Dr. Hamit Sinan HATİPOĞLU  
Üye

  
Doç. Dr. Tuncay ÇELİK  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Ali PARLAR  
Üye

**(İzinli)**  
Avukat Sema Aksu ÖZEL  
Üye

  
Eczacı Gamze GÖK  
Üye



## GENETİK ÇALIŞMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

### LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

Kalp ve damar hastalıklarının genetik (kalıtsal) nedenlerini bulmak üzere yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “**Adıyaman İlinde Akut Koroner Sendrom Olgularında miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi**” dir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen ifade etmek gerekir ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni sizde/ailenizin bir üyesinde koroner arter hastalığının bulunmuş olmasıdır. Adıyaman Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı bu hastalığın nedenlerini ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirilecektir. Sizin de bu çalışmaya katılmanızın araştırmanın başarısı için önemlidir. Araştırmaya katılacak hasta gönüllü sayısı 150’dir.

Muayene esnasında sizden biyokimyasal ve genetik analizler için kan alınacak ve bulgular kaydedilecektir. Bu kayıtlar ileride tekrar incelenerek doğru tanı konulmasına yardımcı olacaktır. Bu kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmayı yapabilmek için kolunuzdan 5-10 (1-2 tüp) ml. kadar kan almamız gerekmektedir. Bu kandan genetik materyal (DNA ve RNA) elde edilecektir. Bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

**Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:** Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya kan alma bölgesinde morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

**Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler:** Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik bilginin gizli kalacağına dair elimizden geleni yapacağız. Ancak hemen belirtmemiz gerekir ki; yaptığımız testler sizin veya ailenizin bir ferdinin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötü yönde kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de etkileyebilir. Sizin anormal bir gen taşıdığınızı saptadığımızda bulgularımızı herhangi bir ücret talep etmeden size bildireceğiz. Ancak böylesi bir bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Yine hemen belirtmeliyiz ki; bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninizle olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne ya da babanın biyolojik kimliğinin de saptanmasıdır. Bu durumlarda gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Yukarıda sayılanlar böylesi bir analizde yaşanabilecek potansiyel risklerdir. Ancak bunlardan en az oranda zarar görmeyi sağlamak için elimizden geleni yapacağız. Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek sorun ve riskler katılımcının/hastanın kendisine ya da sorumlusuna iletilecektir.

**Yapılacak genetik testin getireceği olası yararlar:** Böyle bir analiz ilgili genetik hastalığın nedeninin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Şu anda bu çalışmanın hemen size veya yakınlarınıza bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ileride ilgili hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Eğer örneğinizin imha edilmesine karar verirsiniz, bu isteğinizden önce üretilmiş her türlü veri ve yapılmış analiz ortadan kaldırılmayacak ama daha fazla analiz yapılmayacaktır. Aksi halde, saklama süresinin sonunda örneğin imha edilmesinden destekleyici/araştırmacı sorumludur.

### **Kan Örneklerinin Saklanması**

Bu bilimsel araştırma sırasında alınan kan örneklerinin tamamı kullanılmayıp bir bölümü benzeri araştırmalarda kullanılmak üzere saklanabilir.

### **(Katılımcının/Hastanın Beyanı)**

Sayın Doç. Dr. Mustafa Çetin tarafından Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (gönüllü) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Doç. Dr. Mustafa Çetin'e ulaşabileceğimi ve kendisini arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tım açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir dūřünme sūresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti bŸyŸk bir memnuniyet ve gŸnŸllŸlŸk içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

<b>GŸNŸLLŸNŸN</b>		<b>İMZASI</b>
<b>ADI &amp; SOYADI</b>		
<b>ADRESİ</b>		
<b>TEL. &amp; FAKS</b>		
<b>TARİH</b>		

<b>VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN</b>		<b>İMZASI</b>
<b>ADI &amp; SOYADI</b>		
<b>ADRESİ</b>		
<b>TEL. &amp; FAKS</b>		
<b>TARİH</b>		

<b>ARAşTIRMA EKİBİ DIşINDAN YETKİN BİR HEKİM</b>		<b>İMZASI</b>
<b>ADI &amp; SOYADI</b>		
<b>TARİH</b>		