



T.C.

AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

STEROİD KAYNAKLI FEMUR BAŞI AVASKÜLER NEKROZLU  
HASTALARDA miRNA'LARIN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Didem HIZARBAŞ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. TUBA YILDIRIM

AMASYA

HAZİRAN 2024

T.C.  
AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

STEROİD KAYNAKLI FEMUR BAŞI AVASKÜLER NEKROZLU  
HASTALARDA miRNA'LARIN BELİRLENMESİ

Didem HIZARBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

AMASYA  
HAZİRAN 2024

**DİDEM HIZARBAŞ** tarafından hazırlanan “**STERÖİD KAYNAKLI FEMUR BAŞI AVASKÜLER NEKROZLU HASTALARDA miRNA’LARIN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Tıp** Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum .....

**Üye:** Doç. Dr. Hicabi SEZGİN

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum .....

**Üye:** Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum .....

Tez Savunma Tarihi : 26/06/2024

Saat : 13:00

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....  
Doç. Dr. Neşe YAKŞI  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Sevgili aileme ...

## ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Didem HIZARBAŞ

26.06.2024

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde her konuda benden sevgi, destek ve ilgisini esirgemeyen, bu tez konusunun belirlenmesinde, yürütülmesinde beni destekleyen, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Tuba YILDIRIM'a,

Tez çalışmamda tüm kolaylıkları sağlayarak bana büyük desteği olan, bilgilerini ve tecrübelerini benimle cömertçe paylaşan Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi kıymetli hocam Doç. Dr. Sevgi MARAKLI'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca, desteğini esirgemeyen Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocam sayın Doç. Dr. Burak YAZGAN'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini benimle paylaşan Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocam sayın Prof. Dr. Arif AYAR'a

Yüksek lisans eğitimimde, değerli katkılarını esirgemeyen Hitit Üniversitesi MİTAM Öğretim Görevlisi hocam aynı zamanda arkadaşım sayın Dr. Seda MESCI'ye,

Çalışmalarım için gerekli materyallerin ve verilerin toplanmasında büyük emeği geçen Amasya Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Tıp Bilimleri Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hicabi SEZGİN'e, Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fikriye MİLLETLİ SEZGİN'e ve Biyolog Gözde AKPINAR'a

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen AİLEM'e sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ÖZET .....	xi
ABSTRACT .....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Femur Başı Avasküler Nekrozu (ANFH) .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Epidemiyolojisi .....	4
2.1.2 Etyolojisi .....	4
2.1.2.1 Travmatik nedenleri.....	5
2.1.2.2 Atravmatik nedenleri .....	5
2.1.3 Patogenezi .....	6
<b>2.2 Steroid Hormonlar.....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Steroid hormonları ve ON ilişkisi .....	9
2.2.1.1 Lipit metabolizması.....	10
2.2.1.2 Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin osteogenezinin azalması .....	10
2.2.1.3 Yetersiz kan iletimi .....	10
2.2.1.4 Apoptoz .....	11
2.2.1.5 Gen polimorfizmi .....	11
2.2.1.6 Mikrobiyom.....	11
2.2.1.7 İmmünolojik .....	11

2.2.1.8 Çok vuruşlu hipotez.....	11
2.2.1.9 Kodlamayan RNA'lar .....	12
<b>2.3 MikroRNA (miRNA) .....</b>	<b>12</b>
2.3.1 miRNA biyogenezi .....	13
2.3.1.1 Kanonik miRNA biyogenezi .....	13
2.3.1.2 Kanonik olmayan miRNA biyogenezi .....	15
2.3.2 miRNA'ların tanımlanması.....	16
<b>2.4 SANFH Hastalığı ve miRNA'lar.....</b>	<b>17</b>
<b>2.5 SANFH ile Bağlantılı Genler.....</b>	<b>18</b>
2.5.1 RIPK1 (Reseptörle etkileşime giren serin/treonin protein kinaz 1) .....	19
2.5.2 MAPK (Mitojenle aktiveleşen protein kinaz).....	19
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Biyoinformatik (<i>In siliko</i>) Çalışmalar .....</b>	<b>21</b>
3.1.1 Olgun miRNA'ların miRBase'den alınması.....	21
3.1.2 miRNA'lar ile gen dizilerinin karşılaştırılması .....	22
3.1.3 miRNA için hedef dizilerin belirlenmesi.....	22
3.1.4 miRNA ikincil yapıların oluşturulması .....	22
3.1.5 miRNA'lar arasındaki ilişkinin gösterilmesi .....	23
3.1.6 Genlerin KEGG ve GO analizleri .....	23
<b>3.2 Periferik Kan Örneklerinin Toplanması .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3 miRNA İzolasyonu .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi.....</b>	<b>27</b>
<b>3.5 RT-qPZR .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6 İstatistik .....</b>	<b>29</b>
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Biyoinformatik (<i>In siliko</i>) Çalışmalar .....</b>	<b>30</b>
4.1.1 Olgun miRNA'ların miRBase'den alınması.....	30

4.1.2 miRNA'lar ile gen dizilerinin karşılaştırılması .....	30
4.1.3 miRNA için hedef dizilerin belirlenmesi.....	34
4.1.4 miRNA ikincil yapıların oluşturulması .....	36
4.1.4.1 RIPK1 geni ile homoloji gösteren miRNA'lar .....	37
4.1.4.2 MAPK geni ile homoloji gösteren miRNA'lar.....	38
4.1.5 miRNA'lara ait filogenetik ağaçların oluşturulması.....	45
4.1.6 Genlerin KEGG ve GO analizleri .....	46
<b>4.2 Periferik Kan Örnekleri.....</b>	<b>54</b>
<b>4.3 miRNA İzolasyonu .....</b>	<b>54</b>
<b>4.4 RT-qPZR .....</b>	<b>55</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>59</b>
<b>6. SONUÇ .....</b>	<b>65</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>67</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>82</b>

## TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo 2. 1</b> ANFH'nin ortaya çıkmasına neden olan bazı etkenlerin populasyonlarda görülme oranları.....	5
<b>Tablo 2. 2</b> Steroid çeşitleri, üretildikleri yerler ve görevleri.....	9
<b>Tablo 2. 3</b> Steroidlerin osteosit sağkalımını etkileme yolları.....	10
<b>Tablo 2. 4</b> miRNA'lar ve SANFH üzerindeki etkileri.....	18
<b>Tablo 3. 1</b> Deney için belirlenen gruplar.....	24
<b>Tablo 3. 2</b> Kan örnekleri toplanan bireylere ait bazı bilgiler .....	24
<b>Tablo 3. 3</b> miRNA izolasyon kiti uygulama basamakları .....	25
<b>Tablo 3. 4</b> cDNA sentez prosedürü .....	27
<b>Tablo 3. 5</b> cDNA sentezi için reaksiyon protokolü .....	27
<b>Tablo 3. 6</b> RT-qPZR'de kullanılan karışımlar .....	28
<b>Tablo 3. 7</b> RT-qPZR analizlerinde kullanılan primerler.....	28
<b>Tablo 3. 8</b> Amplifikasyon programı .....	29
<b>Tablo 4. 1</b> RIPK1 geni ve miRNA eşleştirilmesi sonuçları.....	31
<b>Tablo 4. 2</b> MAPK geni ve miRNA eşleştirilmesi sonuçları .....	32
<b>Tablo 4. 3</b> RIPK1 geni ve miRNA'lar arasındaki hibridizasyon bölgeleri.....	34
<b>Tablo 4. 4</b> MAPK geni ve miRNA'lar arasındaki hibridizasyon bölgeleri .....	34
<b>Tablo 4. 5</b> MAPK geninin filogenetik ağacındaki miRNA'ların benzerlik oranları .....	46
<b>Tablo 4. 6</b> miRNA izolasyonu sonuçları .....	54

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 Femur başını besleyen kan damarları .....	6
Şekil 1. 2 Osteonekrozun erken radyografik belirtisi.....	6
Şekil 2. 1 Kanonik ve kanonik olmayan miRNA sentezinin çekirdek ve sitoplazmada geçirdiği işlemler.....	15
Şekil 3. 1 cDNA sentezi ve RTqPZR uygulamalarındaki basamakların gösterimi .....	26
Şekil 4. 1 hsa-miR-6728'in ikincil yapısı.....	37
Şekil 4. 2 hsa-miR-6891'in ikincil yapısı.....	37
Şekil 4. 3 hsa-miR-1202'nin ikincil yapısı.....	38
Şekil 4. 4 hsa-miR-let-7e'nin ikincil yapısı.....	38
Şekil 4. 5 hsa-miR-1203'ün ikincil yapısı.....	38
Şekil 4. 6 hsa-miR-1237'nin ikincil yapısı.....	39
Şekil 4. 7 hsa-miR-1976'nın ikincil yapısı.....	39
Şekil 4. 8 hsa-miR-3194'ün ikincil yapısı.....	39
Şekil 4. 9 hsa-miR-4323'ün ikincil yapısı.....	40
Şekil 4. 10 hsa-miR-4266'nın ikincil yapısı.....	40
Şekil 4. 11 hsa-miR-4290'ın ikincil yapısı.....	40
Şekil 4. 12 hsa-miR-3620'nin ikincil yapısı.....	41
Şekil 4. 13 hsa-miR-4433'ün ikincil yapısı.....	41
Şekil 4. 14 hsa-miR-4436b'nin ikincil yapısı.....	41
Şekil 4. 15 hsa-miR-4486'nın ikincil yapısı.....	42
Şekil 4. 16 hsa-miR-4514'ün ikincil yapısı.....	42
Şekil 4. 17 hsa-miR-4749'un ikincil yapısı.....	42
Şekil 4. 18 hsa-miR-6858'in ikincil yapısı.....	43
Şekil 4. 19 hsa-miR-5787'nin ikincil yapısı.....	43
Şekil 4. 20 hsa-miR-7106'nın ikincil yapısı.....	43
Şekil 4. 21 hsa-miR-6894'ün ikincil yapısı.....	44
Şekil 4. 22 hsa-miR-6730'un ikincil yapısı.....	44
Şekil 4. 23 hsa-miR-5699'un ikincil yapısı.....	44
Şekil 4. 24 MAPK geni ile miRNA'lar arasındaki ilişkinin gösterimi .....	45
Şekil 4. 25 RIPK1 ve MAPK genlerinin fiziksel etkileşimleri (Physical interactions) .....	47
Şekil 4. 26 RIPK1 ve MAPK genlerinin ortak ifadeleri (Co-Expression) .....	48

<b>Şekil 4. 27</b> RIPK1 ve MAPK genlerinin tahmin edilen ilişkileri (Predicted) .....	49
<b>Şekil 4. 28</b> RIPK1 ve MAPK genlerinin genetik etkileşimleri (Genetic interactions).....	49
<b>Şekil 4. 29</b> RIPK1 ve MAPK genlerinin ortak lokalizasyonları (Co Lokalization).....	50
<b>Şekil 4. 30</b> RIPK1 ve MAPK genlerinin yolları (Pathway) .....	50
<b>Şekil 4. 31</b> RIPK1 ve MAPK genlerinin paylaştıkları protein alanları (Shared Protein Domains).....	51
<b>Şekil 4. 32</b> MAPK geni ile bağlantılı olan miRNA'lar.....	52
<b>Şekil 4. 33</b> RIPK1 geni ile bağlantılı olan miRNA'lar .....	53
<b>Şekil 4. 34</b> Kan örneklerinin alındığı bireylerin yaş ortalamaları .....	54
<b>Şekil 4. 35</b> SANFH hastalığının hsa-miR-6891 düzeylerine etkisi.....	55
<b>Şekil 4. 36</b> SANFH hastalığının hsa-miR-5699 düzeylerine etkisi.....	56
<b>Şekil 4. 37</b> 5S geni SANFH hastası Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri .....	56
<b>Şekil 4. 38</b> 5S geni kontrol grubu Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri .....	57
<b>Şekil 4. 39</b> MAPK geni SANFH hastası Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri	57
<b>Şekil 4. 40</b> MAPK geni kontrol grubu Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri ...	57
<b>Şekil 4. 41</b> RIPK1 geni SANFH hastası Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri	58
<b>Şekil 4. 42</b> RIPK1 geni kontrol grubu Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri....	58

## SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

### Açıklama

>	:	Büyüktür
<	:	Küçüktür
%	:	Yüzde
°C	:	Santigrad Derece

### Kısaltmalar

### Açıklama

Ago	:	Argonaute Proteini
AKT	:	Protein Kinaz B
ANFH	:	Femur Başı Avasküler Nekrozu
ARCO	:	Osseous Dolaşım Araştırma Derneği
BMSC	:	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri
CAMK2D	:	Kalsiyum/Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz Tip II
CAPN2	:	Kalpain-2 Katalitik Alt Birimi
DGRC8/Pasha:		DiGeorge Sendromu Kritik Bölge Geni 8
DUSP6	:	Çift Özgüllüklü Fosfataz 6
EARS2	:	Glutamil-tRNA Sentetaz
EGFR	:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELK1	:	ETS Transkripsiyon Faktörü ELK1
ETS1	:	ETS Pro-Onkogen 1
GFAP	:	Gliyal Fibriler Asidik Protein
GO	:	Gen Ontolojisi
HAL	:	Histidin Amonyak-Liyaz
HIV	:	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
KEGG	:	Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi
MAP2K2	:	Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz Kinaz 2

MAPK	:	Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz
MEGA	:	Moleküler Evrimsel Genetik Analiz
miRNA	:	Mikro RNA
MRI	:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSC	:	Mezenkimal Kök Hücreleri
NEB	:	Nebulin
NFL	:	Nöroflament Hafif Zinciri
NGS	:	Yeni Nesil Dizileme
ON	:	Osteonekroz
OPG	:	Osteoprotogerin
PACT	:	İnterferon Kaynaklı Protein Kinaz PKR'nin bir Protein Aktivatörü
PLA2G1B	:	Fosfolipaz A2 Grup IB
PLA2G4A	:	Fosfolipaz A2 Grubu IVA
PPI	:	Protein-Protein Etkileşimi
Pre-miRNA	:	Precursor miRNA
Pri-miRNA	:	Primer miRNA
PTPRR	:	Protein Tirozin Fosfataz Reseptör Tipi R
Ran GTP	:	GTP Bağlayıcı Protein Olan Ras ile İlişkili Nükleer Protein
RANK	:	Nükleer Faktör Kappa-B'nin Reseptör Aktivatörü
RANKL	:	Nükleer Faktör Kappa-B Ligandının Reseptör Aktivatörü
RBP	:	RNA Bağlayıcı Protein
RIPK1	:	Reseptörle Etkileşime Giren Serin/Treonin Protein Kinaz 1
RIPK3	:	Reseptörle Etkileşime Giren Serin/Treonin Protein Kinaz 3
RISC	:	RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
RLC	:	RISC Yükleme Kompleksi
RNA	:	Ribonükleik asit
RPS6KA5	:	Ribozomal Protein S6 Kinaz A5
RT-qPZR	:	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SANFH	:	Steroid Kaynaklı Femur Başı Avasküler Nekrozu
SLE	:	Sistemik Lupus Eritematozus
sncRNA	:	Küçük Kodlamayan RNA

Tgif2	:	Transfotming Büyüme Faktörü Beta'nın İndüklediği Faktör Homebox 2
TNF	:	Tümör Nekroz Faktörü
TNFRSF1A	:	TNF Reseptörü Üst Aile Üyesi 1A
TRADD	:	Ölüm Alanı Aracılığıyla İlişkili TNFRSF1A
TRBP	:	Transaktive Edici Yanıt (TAR) RNA Bağlayıcı Protein
TRIM38	:	Üçlü Motif İçeren 38
TUB	:	TUB İki Parçalı Transkripsiyon Faktörü



## ÖZET

### STEROİD KAYNAKLI FEMUR BAŞI AVASKÜLER NEKROZLU HASTALARDA miRNA'LARIN BELİRLENMESİ

Didem HIZARBAŞ

Amasya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Haziran/2024  
Danışman: Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

Avasküler nekroz; hücre ölümünün, kırılmanın ve etkilenen bölgenin çökmesinin görüldüğü zamanla ilerleyen bir hastalıktır. Ayrıca üst ekstremitelerde, dizler, omuzlar ve ayak bilekleri gibi pek çok kemikte gelişebilir ve farklı zamanlarda birden fazla kemikte ortaya çıkabilir. Oluşumuna travmatik ve atravmatik faktörler doğrudan katkıda bulunabilir. Steroid kullanımı atravmatik faktörlerden birisidir. Osteoblast farklılaşması, osteoblast ve osteoklast apoptozu, lipid metabolizması, pıhtılaşma yolları ve kalsiyum metabolizması üzerindeki etkilerinden dolayı steroidlerin neden olduğu avasküler nekroz anlaşılması en zor olanıdır.

Steroid hormonları, gonadlar, adrenal bezler ve plasentadaki çoklu enzimler tarafından, steroidogenez yoluyla kolesterolden sentezlenen önemli biyomolekül sınıfıdır. Steroidler pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmasına rağmen osteoblast ve osteoklastların üretimini azalttığı, osteoklastların ömrünü uzattığı ve osteoblastların apoptozunu arttırdığı bilinmektedir.

miRNA'lar; hayvanlarda ve bitkilerde çok sayıda hedef gen ile etkileşime girerek temel biyolojik süreçlerin ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, türler arasında korunan kodlamayan RNA'lardır. miRNA'ların değişen ekspresyon seviyeleri çeşitli hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır. SANFH'nda miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin değiştiği ve osteoblast farklılaşmasında rol oynadıkları gösterilmiştir. Bu nedenle kemik homeostazisinde düzenleyici rol oynamaları pratikte de biyobelirteç olarak kullanılabilirler göstermektedir.

Tez çalışması sonucunda; *in silico* yöntemleri kullanarak SANFH ile ilgili RIPK1 ve MAPK genlerine ait miRNA dizileri belirlenerek aralarındaki ilişki incelendikten sonra RIPK1 geni için miR-6891 ve MAPK geni için miR-5699 RT-qPCR analizlerinde kullanılmak üzere seçildi. Amasya Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'na başvuran SANFH tanısı koyulmuş 15 ve SANFH tanısı almamış 15 hastadan periferik kan örnekleri toplanarak tam kandan miRNA izolasyonu yapıldı. RT-qPCR sonuçları SANFH'li bireylerin kanında hsa-miR-6891' in ekspresyonunun azaldığını, hsa-miR-5699 seviyesinin SANFH'li bireylerde yüksek olduğunu gösterdi. Elde edilen bulgular doğrultusunda, hsa-miR-6891 ve hsa-miR5699'un steroid kaynaklı femur başı avasküler nekroz hastalığı ile ilişkilendirilebileceği, hastalığın tanı ve teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *In silico* analizler, MAPK, miRNA, Osteonekroz, RIPK1, SANFH,

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION of miRNAs in PATIENTS WITH STEROID-INDUCED FEMORAL HEAD AVASCULAR NECROSIS

Didem HIZARBAŞ

Amasya University, Institute of Health Sciences  
Department of Molecular Medicine, MSc, June/2024  
Supervisor: Prof. Tuba YILDIRIM

Avascular necrosis (AVN) is a progressive bone disorder characterized by cell death, structural collapse, and eventual functional impairment of the affected area. Notably, AVN can develop in various bones, including the upper extremities, knees, shoulders, and ankles. It can even affect multiple bones at different times. Both traumatic and atraumatic factors contribute to AVN formation, with steroid use being a prominent atraumatic contributor. Steroid-induced AVN (SANFH) presents a particularly complex challenge due to its multifaceted effects on bone physiology. These effects encompass osteoblast differentiation, osteoblast and osteoclast apoptosis, lipid metabolism, coagulation pathways, and calcium homeostasis.

Steroid hormones are essential biomolecules synthesized from cholesterol through a process called steroidogenesis. While corticosteroids are invaluable in treating various diseases, they are known to disrupt bone homeostasis by reducing the production of osteoblasts and osteoclasts while simultaneously prolonging osteoclast lifespan and promoting osteoblast apoptosis.

MicroRNAs (miRNAs) are short, non-coding RNAs that act as powerful gene regulators across diverse biological processes in animals and plants. They achieve this by interacting with a vast array of target genes. Notably, miRNAs are highly conserved across species, and their altered expression levels serve as diagnostic tools for various diseases. Recent research suggests that miRNA expression levels are dysregulated in SANFH, particularly those involved in osteoblast differentiation. This observation highlights their potential as biomarkers for clinical practice.

In the present study, we employed *in silico* methods to identify miRNA sequences associated with SANFH-related genes RIPK1 and MAPK. We then evaluated the relationship between these sequences and selected hsa-miR-6891 for the RIPK1 gene and hsa-miR-5699 for the MAPK gene for further analysis using RT-qPCR. Peripheral blood samples were collected from 15 patients diagnosed with SANFH and 15 patients without a diagnosis of SANFH who applied to Amasya Sabuncuoğlu Şerefeddin Training and Research Hospital, Department of Orthopedics and Traumatology, and total RNA was isolated for miRNA analysis. Our RT-qPCR results revealed a significant downregulation of hsa-miR-6891 expression in the blood of individuals with SANFH. While hsa-miR-5699 levels exhibited an upward trend in the SANFH group, this increase did not reach statistical significance. Based on these findings, we hypothesize that hsa-miR-6891 and hsa-miR-5699 may be associated with SANFH and hold promise as potential biomarkers for disease diagnosis and prognosis.

**Key Words:** *In silico* analyses, MAPK, miRNA. Osteonecrosis, RIPK1, SANFH

## 1. GİRİŞ

Osteonekroz (ON), kemiğe yeterli kan akışının olmaması veya kemiğe oksijen taşınmasının bozulması sonucunda hücre ölümüne, kırılmaya ve etkilenen bölgenin çökmesine yol açan zamanla ilerleyen bir hastalıktır [1]. Avasküler nekroz, aseptik nekroz, osteokondritis dissekans veya iskemik kemik nekrozu olarak da adlandırılan ON; üst ekstremitelerde, dizler, omuzlar ve ayak bilekleri gibi pek çok kemikte gelişebilir ve farklı zamanlarda birden fazla kemikte ortaya çıkabilir [2-4]. Osseous Dolaşım Araştırma Derneği'nin (ARCO) Adlandırma ve Evreleme Komitesi, 1992 yılında, femur başındaki nekrotik lezyonlar için "Osteonekroz" adının kullanılmasını kabul etti [5]. ON'lerin %70'i iki taraflı ve hatta çok odaklıdır, aynı anda iskeletin birden fazla bölgesini etkiler [6]. En yaygın olarak kalça ekleminde femur başında görülür, femur başı avasküler nekrozu (ANFH) femurun proksimal ucuna kan akışının bozulması sonucunda osteosit ölümüne yol açan, tipik olarak femur başı çökmesi ve kalça ekleminde fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanan bir tür aseptik osteonekrozdur [3, 4, 7, 8]. 20-65 yaşları arasındaki fiziksel olarak aktif, genç yetişkin insanlarda daha sık görülmektedir [3, 7, 9]. Erken evre ANFH genellikle asemptomatiktir ve yoğun steroid kullanımından birkaç yıl sonra gelişir [10]. Bu nedenle erken tanı ile total kalça protezi uygulaması dışında seçenekler sunmak, femur başı çökmesinden önce kalça ekleminin bütünlüğünü korumaya yönelik etkili tedaviler geliştirmek kritik öneme sahiptir [7, 8]. ANFH'nin spesifik olmayan semptomları hastaların cerrahi olmayan tedavi alma şansını kaybetmesine neden olur, hastalığın erken evrelerde tespit edilmesi ile çok çeşitli eklem koruyucu tedavi yöntemlerinden yararlanılabilir [11, 12].

Steroidler, romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır ancak bu tedavi steroid kaynaklı femur başı avasküler nekrozu (SANFH) gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilir [13]. Steroid kullanımı avasküler nekroz ile ilişkili olmasına rağmen her zaman direkt ve nedensel bir ilişki bulunmamaktadır [14]. Harvey Cushing, yüksek steroid kullanımının kemik dokusu üzerinde olumsuz etkisi olduğunu ilk defa 1930'ların başında fark etmiştir [15]. Yüksek miktarlarda steroid kullanımı kemik miktarından çok kemik kalitesini olumsuz etkilemektedir [16]. Kemik oluşumunda önemli görevleri olan osteoblastlar steroidlerin hedefleri arasındadır [17]. miRNA'lar ise osteoblast ve osteoklastın yeniden dengelenmesi, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşması, kemik mikrovasküler endotel

hücrelerinin aktivasyonu ile bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu gibi birçok süreçte yer almaktadırlar [18].

MikroRNA'lar (miRNA) hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümü gibi çeşitli süreçlerde rol alan, hedef mRNA'ların ekspresyonunu düzenlemek için mRNA'ların 3'-çevrilmemiş bölgelerine (3'-UTR) bağlanarak hedef genlerin susturulmasını düzenleyen, 19-25 nükleotit boyutunda, tek sarmallı, yüksek oranda türler arasında korunduğu bilinen sncRNA (küçük kodlamayan RNA) sınıfıdır [19-22]. miRNA'ların yaklaşık olarak %30'u protein kodlayan genlerin intronlarından, geri kalanı ise özel miRNA gen lokuslarından sentezlenir [23]. Tek bir miRNA, yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilir ve genellikle işlevsel bir etkileşim yolunda yer alan birçok genin ifadesini etkileyebilir ve tüm protein ağlarını düzenleyebilir [19, 20]. Son yıllarda yapılan araştırmalarla miRNA'ların insan hastalıklarına işaret ettiği kanıtlanmıştır ve RNA susturma işleminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [12].

Dolaşımdaki miRNA'lar; yüksek özgüllük, kolay erişilebilirlik ve hassasiyet dahil olmak üzere pek çok kriterleri karşılamaları ve çoklu kanser oluşumu ve gelişiminin düzenlemesi, Alzheimer, romatoid artrit, obezite gibi insana ait çeşitli hastalıklarda görev almaları nedeniyle tanısız biyobelirteçler haline gelmektedirler [21, 24, 25]. Aynı zamanda osteogenez, osteoklastogenez ve adipogenezin düzenlenmesinde rol alması nedeniyle iskelet hastalıklarının tedavisi için yeni bir hedef olarak gösterilmektedir [26, 27]. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin de (MSC) (Bone Marrow Stem Cell-BMSC) farklılaşmasını yönlendirerek kemiğin yeniden şekillenmesini etkileyebildiklerini göstermektedir. Bu nedenle miRNA'lar SANFH sürecinde rol alan kritik bir araç olarak kabul edilmektedir [12, 28]. Araştırmacılar SANFH'nin mekanizmasını incelediklerinde miRNA'ların gen düzenleyicileri olarak rol aldıkları doğrulanmıştır. Bu nedenle miRNA'ların SANFH gelişim hızını yavaşlatabildikleri bilinmektedir [12, 18].

Bu tez çalışmasının; steroid kaynaklı femur başı avasküler nekrozu hastalığının gelişiminin açıklanmasına, biyobelirteç olarak kullanılacak miRNA'ların belirlenmesine ve yeni terapötik yan ürünlerin araştırılmasına katkı sağlaması amaçlanmıştır. Bu nedenle *in silico* yöntemler kullanılarak insana ait miRNA dizilerinin elde edilmesinde miRBase, SANFH hastalığı ile ilişkili olan RIPK1 ve MAPK genlerinin kullanımına karar verilmesinde NCBI sitesindeki BLASTn, hedef genlerin tanımlanmasında RNAhybrid, miRNA'ların ikincil yapılarının oluşturulmasında RNAfold ve miRNA'lar arasındaki ilişkiyi

gösteren filogenetik ağaçların çizilmesinde MEGA programı kullanıldı. Hedef genlerin rol aldığı yolların belirlenmesi için KEGG ve GO analizleri GeneMANIA ve miRTargetLink 2.0 web programı ile yapıldı. SANFH ile ilgili RIPK1 geni için hsa-miR-6891 ve MAPK geni için hsa-miR-5699 seçilerek primer dizisi tasarlandı. Amasya Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji servisine başvuran hastalardan bir tüp periferik kan örneği alındı ve tam kandan miRNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen miRNA'larda cDNA sentezi yapıldı ve MAPK için hsa-miR-5699 ve RIPK1 için hsa-miR6891 seviyeleri RT-qPZR yöntemi kullanılarak ölçüldü. Son olarak RT-qPZR sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. Elde edilen bulgular doğrultusunda, hsa-miR-6891 ve hsa-miR5699'un SANFH hastalığı ile ilişkilendirilebileceği, hastalığın tanı ve teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Femur Başı Avasküler Nekrozu (ANFH)

#### 2.1.1 Epidemiyolojisi

Bazı ülkeler kendi osteonekroz popülasyonlarını taramış olsa da ANFH'nin kesin insidansı, az-septomatik veya asemptomatik olması nedeniyle çok az bilinmektedir ve dünya çapında ANFH hakkında epidemiyolojik bir rapor bulunmamaktadır ancak yıllık insidansı iyi bilinmektedir [6, 29]. 1989-2003 yılları arasında tüm osteonekroz türlerinin yıllık insidansı iki katına çıkmıştır ve prevalansı da giderek artmaktadır. Bunun artan farkındalıktan mı yoksa Manyetik Rezonans Görüntülemenin (Magnetic Resonance Imaging-MRI) daha sık kullanılmasına bağlı olarak tanınan ilerlemelerden mi kaynaklandığı bilinmediği için gerçek bir artış olup olmadığı belli değildir [4, 9].

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl 10 000-20 000 arasında yeni ANFH vakası teşhis edilmektedir, toplam total kalça protezi uygulamalarının yaklaşık %10'unun sebebini bu hastalık oluşturmaktadır. Birleşik Krallık'ta ise yılda 100 000 kişi başına 1,4-3,0 kişiyi etkilemektedir ve 50 yaşın altındaki hastalarda total kalça protezi uygulamasının en yaygın üçüncü nedenidir [6, 7, 9]. Güney Kore'de ANFH'nin yıllık görülme sıklığı 2002'de 9 870'den 2006'da 18 691'e çıkmıştır [5]. Japonya'da yıllık görülme oranının 2010'dan 2013'e kadar olan araştırmalarda 2 400'den fazla olduğu tahmin edilmektedir [5]. Çin'de ANFH hastalarının kümülatif sayısı 2013 yılında 8,12 milyona ulaşmıştır [5].

#### 2.1.2 Etyolojisi

1830'larda Fransız anatomist ve patolog Jean Cruveilhier, femur başı nekrozunu, etiyolojisi damar hasarı olan kalça travmasının geç bir komplikasyonu olarak tanımlamıştır [5]. ANFH'nin çoğunlukla genetik yatkınlık, metabolik faktörler ve damar hasarı, artan intraosseöz basınç ve mekanik stresler dahil olmak üzere kan akışını etkileyen lokal faktörlerin birleşik etkilerinden kaynaklandığına inanılmaktadır ancak gelişimine neden olan mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır [3]. ON'ye yol açan en yaygın üç genel mekanizma; mekanik kan damarı kesintisi, trombotik intravasküler oklüzyon ve ektravasküler kompresyondur [30]. Vakaların yaklaşık %70'inde etiyoloji bulunabilirken %15-30'unda tanımlanabilir bir etiyolojik faktör yoktur ve idiyopatik olarak adlandırılmıştır [30, 31]. ANFH oluşumuna sık olarak travma, steroidler, alkolizm, orak

hücre hastalığı, radyasyon, Gaucher hastalığı ve Caisson hastalığı (dekompresyon hastalığı) gibi travmatik ve atravmatik faktörler doğrudan katkıda bulunabilir [3, 4, 31] (Tablo 2.1). Hormon kullanımından kaynaklanan ANFH, travmatik değildir ve temel belirtileri gözden kaçırılabilen kalça ve kasık ağrısıdır. Bu nedenle tedavi için en uygun zaman bilinemeyebilir [32].

### 2.1.2.1 Travmatik nedenleri

Travma, ON'nin en yaygın nedenidir; kan akışını bozar ve osteosit ölümüne yol açar [1]. ON'nin travmatik nedenleri arasında femur boynu kırıkları veya çıkıklarının yanı sıra kemik iliği elemanlarının radyasyon, disbarizm veya Caisson hastalığına bağlı olarak doğrudan yaralanması yer alır [3].

### 2.1.2.2 Atravmatik nedenleri

ON ile ilişkili travmatik olmayan pek çok durum bulunmaktadır. Kabul edilen ve yaygın görülen ilişkilerden bazıları arasında; uzun süreli ve yüksek dozda steroid kullanımı, alkol kullanımı, SLE, orak hücreli anemi, Legg-Calve-Perthes sendromu gibi konjenital defektlerden, radyasyona veya sitotoksik ajanlara maruz kalmaya kadar çeşitli doğal ve iatrojenik durumlar bulunmaktadır [2, 3, 30] (Tablo 2.1). Gaucher hastalığı, disbarizm, İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (Human Immunodeficiency Virus – HIV), hiperlipidemi, pankreatit ve gut hastalığı daha az yaygın olarak ilişkilendirilmektedir [30].

**Tablo 2. 1** ANFH'nin ortaya çıkmasına neden olan bazı etkenlerin populasyonlarda görülme oranları.

ANFH nedenleri	Görülme oranı
Kalça çıkığı görülen hastalarda	%20 [3]
Steroid kullanan hastalarda	%0,6- %40 [3, 6, 15]
Alkol kullanan hastalarda	%20-%30 [3, 6, 7]
Steroid ve alkol kullanımı birlikte olan hastalarda	>%80 [3, 9, 31]
Orak hücre hastalarında	%50 [3]
SLE hastalarında	%3-%35 [3]
Gaucher hastalarında	%60 [3]
Organ nakli yapılan hastalarında	%2-%37 [6]
Bilinmeyen	%20 [3]

### 2.1.3 Patogenezi

Osteonekroz, kemiğe yeterli kan akışının olmaması veya kemiğe oksijen taşınmasının bozulması sonucunda hücre ölümüne ve etkilenen bölgenin çökmesine yol açan zamanla ilerleyen bir hastalıktır. Osteonekrozda, osteoblastlardan kemik oluşumu ile osteoklastların kemik emilimi eşit miktarda gerçekleşmez bu nedenle nekrotik kemiğin yeri doldurulamaz ve yapısal olarak sağlam olmayan kemik dokusu bulunan bir bölge oluşur (Şekil 1.1 ve 1.2) [1].



Şekil 1. 1 Femur başını besleyen kan damarları [33]



Şekil 1. 2 Osteonekrozun erken radyografik belirtisi [33]

ON patogenezi çocuklarda ve yetişkinlerde çok benzerdir, yaş grupları arasında görülen farklılık kırıkta olgunluktur. Çocuklarda epifiz büyüme kırıkta bulunduğundan femur başında meydana gelen kayıplar onarılabilir; ancak olgun hastalardaki ince epifiz kırıkta büyüme yeteneği olmadığı için telafi edemez [34]. Trombosit üreten femur başına ve kemik iliğine kan akışının olmaması hücre ölümlerine neden olur, ilk ölen hücre grubu kemik iliği hücreleridir, bunu osteoblastlar ve osteositler takip eder [3, 34]. ANFH lezyonları; toplam kemik hacminde azalma, artan kemik kırılabilirliği ve sıkı kemik doku hücresi nekrozu ile birlikte kemik mikroyapı hasarı ile karakterize edilir ve ışık mikroskopu altında ölü kemik hücrelerinin gözlemlenmesi nekrozun en önemli işareti. [34, 35]. ON'nin gelişimi birbirini takip eden iskemi ve rejenerasyon olmak üzere iki aşamaya ayrılabilir. Sadece iskemik dönem erken dönem olarak kabul edilebileceğinden, erken dönemde röntgen görüntülerinde hastalık belirtilerinin olmadığı söylenebilir [34].

Travmatik olmayan osteonekrozun patogenezi travmatik osteonekrozdan daha karmaşıktır. Steroidlerin, çoğunlukla birbiriyle ilişkili olan osteoblast farklılaşması, osteoblast ve osteoklast apoptozu, lipid metabolizması, pıhtılaşma yolları ve kalsiyum metabolizması üzerindeki etkilerinden dolayı neden olduğu osteonekrozun anlaşılması en zor olanıdır [36]. ANFH oluşumuna sık olarak alkol, orak hücre hastalığı, genetik, kırık ve çıkık, Caisson hastalığı, Gaucher hastalığı ve steroidler gibi travmatik ve atravmatik faktörler etkilidir [3, 4, 31].

Alkol: Alkol tüketimi, fosfolipid ve sitokin metabolizması üzerinde etkilidir. Aşırı lipid oluşumu, artan hücre içi lipid birikimleri, kemik oluşumunun azalması sonucunda osteosit ölümüne ve ON'a yol açmaktadır [2, 3, 34].

Orak hücre: Orak hücre damar tıkanıklığına ve ON'ye neden olabilir [3].

Genetik: ON'un ilişkili risk faktörlerinin altında yatan genetik bir temele sahip olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır [3]. Damar sisteminde trombüs oluşumu, pıhtılaşma yolu, iskemi, anjiyogenez, apoptoz, lipid biyosentezi ve kemiğin yeniden şekillenmesinde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin farklı ekspresyonunun ANFH'nin son aşamaya ilerlemesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yapılan genotipleme çalışmaları da gen kodlayan protein polimorfizmlerinin ANFH ile ilişkisini göstermektedir [34].

Kırık ve çıkık: Femur boynu kırıkları veya çıkıkları, kemikteki normal damar desteğinin hasar görmesi sonucunda etkilenen bölgede kan akışının bozulmasına neden olur [3, 14].

Caisson Hastalığı (Dekompresyon-Disbarizm): Arteriyollerin nitrojen kabarcıkları oluşumu ile tıkanmasına yol açar [3].

Gaucher Hastalığı: Lizozomal depo hastalığı olan Gaucher hastalığında hücreler kemik iliğine ilerleyerek intramedüller basıncı artırır [6].

Kalp damar hastalıkları: Yapılan bir araştırmada, ON hastalığı görülen kişilerde hastalığın ortaya çıkmasından sonraki üç yıllık sürede koroner kalp hastalıklarının görülme riskinin daha fazla olduğu belirtilmiştir [37].

Steroidler: Kan damarlarında meydana gelen daralmaya bağlı olarak arterlerde mikroemboli, yağ metabolizmasında değişiklikler, indüklenen kök hücre anormallikleri, osteoblast ve osteoklast üretiminin azaltılması, osteoblastların apoptozunun artırılması, pıhtılaşma gibi çeşitli mekanizmalarda değişikliklere sebep olur [1, 3, 4]. Yüksek doz ve uzun süreli steroid kullanımında risk 10-20 kat artmaktadır [1, 30].

Günümüzde pek çok hastalığın tedavisinde hormonlar kullanılmaktadır. Uzun süreli hormon tedavisi kemik oluşumunun azalmasına, kırık parçalarının birikmesiyle kemik yapısının seyrekleşmesine ve sonucunda da SANFH'ye neden olmaktadır [32, 34].

## 2.2 Steroid Hormonlar

Steroid hormonları, gonadlar, adrenal bezler ve plasentadaki çoklu enzimler tarafından, steroidogenez yoluyla kolesterolden sentezlenen önemli biyomolekül sınıfıdır [38-40] ve beyinde de nörosteroidler üretilmektedir [41]. Steroid hormonları, su ve tuz dengesinin düzenlenmesi, metabolizma ve stres tepkisi, eşeyssel olgunlaşma ile üremenin başlatılması ve sürdürülmesi gibi pek çok önemli role sahip, dört halkalı organik moleküllerdir [39, 41]. İşlevlerine göre kortikosteroidler, üreme steroidleri ve nörosteroidler olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar [38] (Tablo 2.2).

Steroidler, düşük konsantrasyonlarda bulunmasına rağmen endokrin, parakrin ve intrakrin düzenlemede kritik rol oynamaktadır [40, 42]. Bu nedenle steroid bazlı antiinflamatuvarlar, antialerjik ajanlar vb. kanser, obezite, diyabet, romatoid artrit gibi ciddi hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır [43]. Steroidler; romatizmal, otoimmün ve alerjik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır ancak osteoblast ve osteoklastların üretimini azaltır, osteoklastların ömrünü uzatır ve osteoblastların apoptozunu artırır.

**Tablo 2. 2** Steroid çeşitleri, üretildikleri yerler ve görevleri

Steroid grubu	Üretildiği yer	Steroid çeşidi	Görevi
Kortikosteroid hormonlar	Adrenal korteks		Stres tepkisi, glikoz metabolizması, bağışıklık tepkisi, iltihaplanma, elektrolit seviyelerinin düzenlenmesi [38, 42]
		Mineralokortikoidler	Sodyumun emilimi, potasyumun atılımı, su alımını artırır. Böylece sıvı homeostazisini düzenleyerek sistemik kan basıncını korunması [39]
		Glukokortikoidler	Hepatik glukoneogenezde kullanılmak üzere protein ile glikojenin parçalanmasının ve yağ asitlerinin vücuttan salınmasının uyarılması [39]
Eşeyssel steroid hormonlar	Gonadlar		İkincil cinsiyet özellikleri, üreme fonksiyonları
		Progesteronlar	Hamileliğin devamı, menstrual döngünün düzenlenmesi [38]
		Östrojenler	Kadınlarda ikincil dişi karakterlerin belirlenmesi, üremenin düzenlenmesi [39]
		Androjenler	Erkeklerde ikincil erkek karakterlerin belirlenmesi, üremenin düzenlenmesi [39]
Nörosteroid hormonlar	Beyin		Beyinde aktiftir [38]
		Feromonlar	Aynı türün bireyleri arasında çeşitli davranış veya fizyolojik tepkileri ortaya çıkarılması [38]

Yüksek dozlarda ve uzun süreli steroid tedavisi SANFH riskini artırır [4, 44]. SANFH’de femur başı kesitlerinde bol miktarda apoptotik osteosit tespit edilmiştir. Apoptotik kemik hücreleri, alkol nedenli ANFH’de nadir, travma sonrası ANFH’de ise görülmemektedir [4]. Yapılan çalışmalarda, SANFH hastalarında bulunan mezenkimal kök hücrelerinin proliferasyon yeteneğinin daha az olduğu gösterilmiştir [30].

### 2.2.1 Steroid hormonları ve ON ilişkisi

Steroidler ve ON arasındaki ilişki nekroza neden olabilecek kesin doz bilinmediği için tam olarak belirlenememiştir [2]. 1998’de 3 000 travmatik ON vakası üzerinde yapılan bir çalışmada vakaların üçte birinden fazlasına steroidlerin yol açtığı ortaya çıkarılmıştır (Tablo 2.3). Steroid kullanım süresinin uzunluğu ve dozu ne kadar fazla ise ON görülme olasılığı o kadar fazla olmaktadır [2].

**Tablo 2. 3** Steroidlerin osteosit sağkalımını etkileme yolları

<b>Steroidlerin osteosit sağkalımını etkileme yolları</b>	Lipid metabolizması
	Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin azalmış osteogenezi
	Yetersiz kan iletimi
	Hücre apoptozu
	Gen polimorfizmi
	Mikrobiyom
	İmmünolojik
	Çoklu vuruş hipotezi
Kodlanmayan RNA'lar	

### 2.2.1.1 Lipit metabolizması

Steroidlerin kullanımı deri altı yağ mobilizasyonu artırır. Uygulama süresi uzadıkça, kan lipit seviyeleri artar. Bu da karaciğer yağlanması, adipositlerin büyümesine, osteositlerde lipit birikiminin artmasına, mikrodamarlarda yağ embolisine, kemik iliği stromal hücrelerinin adipogenezine, medüller boşlukta yağ birikmesine ve medüller basıncının artmasına neden olmaktadır [2, 45]. Steroid kullanımı sonucu oluşan hiperlipidemi, femur başı intramedüller dokusunda yağ birikmesine, intrakortikal basıncın yükselmesine, kan akışının kısıtlanmasına ve bunun sonucunda da ON'ye neden olmaktadır [36]. Steroid kaynaklı lipit metabolizması bozukluğunun; mikrovasküler yağ embolizasyonu ve osteositlerde yağ birikmesi olmak üzere iki ana mekanizması vardır [45].

### 2.2.1.2 Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin osteogenezinin azalması

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri, pluripotent kök hücrelerdir [45]. Yapılan bir araştırma SANFH'de kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik kapasitesinde azalma olduğunu göstermektedir [2]. Femur boynu kırığı olan hastalardan alınan mezenkimal kök hücreler, SANFH hastalarından alınan hücrelerle karşılaştırıldığında daha fazla hücresel büyüme potansiyeli ve olgunlaşmış kemiğe farklılaşma yeteneğinin olduğu görülmüştür [45].

### 2.2.1.3 Yetersiz kan iletimi

Chandler ve arkadaşları 1948'de; trombüs, plak veya emboliler ile damarların tıkanmasının osteonekrozda rol oynayabileceğini ileri sürülmüşlerdir [2]. 1970'lerde ise damar içi pıhtılaşmanın ANFH ile doğrudan ilgisi olduğu düşünülerek "kemik nekrozunun yaygın damar içi pıhtılaşma teorisi" ileri sürüldü [45]. Steroidler, endotel hücrelerine hasar

vererek trombüs oluşumuna yol açarlar ve aşırı pıhtılaşmayı arttırlar. Steroidler, aynı zamanda plazma plazminojen aktivatörü inhibisyonu ile doku plazminojen aktivasyonu arasındaki dengeyi etkileyerek fibrinolizin azalmasına ve pıhtı oluşumuna yol açabilirler [2, 36].

#### **2.2.1.4 Apoptoz**

Apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür. Bir hücre öldükten sonra geride kalan kalıntıların organize şekilde temizlemesini sağlar. Osteoklastların ve osteoblastların apoptozunun artması kemik oluşumunu etkileyerek süngerimsi kemik oluşumunun artmasına neden olabilir. Steroidlerin inflamatuvar etkilerinden birisi de apoptotik yollardır ve yapılan araştırmalarda steroid verilen farelerde ve insanlarda osteoblast ve osteosit apoptozunda bir artış olduğu görülmüştür. Steroid ilişkili osteonekroz gelişen hastaların femur başındaki "kırık hilal" yapısının yakınlarında apoptotik osteositler bulunmuştur [2, 45].

#### **2.2.1.5 Gen polimorfizmi**

Birçok bilim insanı, lipit taşıma proteinlerindeki genetik polimorfizmlerin, insanlarda osteonekroz gelişme riski gösterebileceğini ileri sürmüştür [36].

#### **2.2.1.6 Mikrobiyom**

Bazı çalışmalar bağırsak mikrobiyotasının kemiğin yeniden şekillenmesinde, büyümesinde, gelişmesinde ve kemiğin mekanik dayanıklılığında rol oynadığını ileri sürmüştür [2, 45].

#### **2.2.1.7 İmmünolojik**

Steroidlerin; kırıkta, osteoblast, osteoklast ve osteositlerde bulunan steroid reseptörlerine bağlanmasının, immünojenik hücreler içindeki apoptotik yollar ile antiinflamatuvar yanıtı indüklediği düşünülmektedir [36].

#### **2.2.1.8 Çok vuruşlu hipotez**

Kenzora'nın 1983 yılında ortaya attığı "Kümülatif Stres Teorisi"nde sistemik hastalığı olan insanlarda steroid kaynaklı avasküler nekroz oranının daha yüksek olduğunu, steroidlerin ON'yi hızlandığını ileri sürmektedir. Farklı birçok araştırmacı da SANFH'de

tek bir mekanizmanın hastalığa yol açmak için yeterli olmadığını, çeşitli faktörlerin aynı anda ortaya çıkması gerektiğini ileri sürmüştür [2, 36].

### 2.2.1.9 Kodlamayan RNA'lar

Son yıllarda gelişen moleküler biyoloji ile yapılan çalışmalarda miRNA'ların da dahil olduğu kodlamayan RNA'ların insana ait pek çok hastalıkta olduğu gibi SANFH patogenezinde de güçlü düzenleyiciler olduğu gösterilmiştir [12, 46]. Kemik metabolizmasında görülen transkript seviyelerindeki veya miRNA salgı seviyelerindeki değişiklikler, iskelet hastalıklarının gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilidir [47].

Yapılan araştırmalar sonucu elde edilen bulgularda normal ve hastalıklı ortamlarda genomun protein kodlamayan kısmının gen ekspresyonunun düzenlenmesi için çok önemli olduğu gösterilmiştir. Bu durum özellikle kodlamayan küçük RNA'ların bir sınıfı olan miRNA'lar için belirgindir [48]. SANFH'de miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin değiştiği ve osteoblast farklılaşmasında rol oynadıkları gösterilmiştir [12, 46]. miRNA'lar kemik homeostazisinde düzenleyici rol oynamaları nedeniyle pratikte biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [47].

### 2.3 MikroRNA (miRNA)

miRNA'lar; hayvanlarda ve bitkilerde çok sayıda hedef gen ile etkileşime girerek temel biyolojik süreçlerin genetik düzenleyicisi olan, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan ve türler arasında korunan kodlamayan RNA'lardır [19, 24, 49, 50]. Değişen miRNA ekspresyon seviyeleri çeşitli hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır [49]. İnsana ait genlerin üçte birinden fazlasının miRNA'lar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir, bu da miRNA'ların gen ifadelerini düzenlemede önemli roller oynadığını göstermektedir [51]. miRNA'lar hedef mRNA'lara bağlanarak mRNA bozulmasına yol açar ve translasyonu durdururlar [23].

1993 yılında *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) larvalarında bulunan ilk miRNA Lin-4 olarak isimlendirildi ve 2000 yılında ise ilk insan miRNA'sı Let-7 bulundu. Günümüzde insana ait 2 675 olgun miRNA keşfedilmiş olup "miRBase" veri tabanından (<http://www.mirbase.org>) indirilebilir [24, 52]. Genel olarak miRNA kodlayan genlerin çoğu intergenik veya intragenik bölgelerde bulunur, genellikle kodlama ekzonları içinde yer almaz [53, 54]. Hücrelerin toplam RNA içeriğinin %0,02'sinden azını oluşturur [55].

miRNA'lar eksozomlara veya mikropartiküllere paketlenabilir ve hücre dışı ortama salgılanabilir. Bu nedenle hücre ve dokulardan izole edilebildiği gibi serum, plazma, gözyaşı ve idrar gibi vücut sıvılarından da izole edilebilir ve uzun mesafeli hücre-hücre iletişimini gerçekleştirebilir [24].

### 2.3.1 miRNA biyogenezi

Yapılan bazı çalışmalar, olgun miRNA'ların biyogenezinin en az %40'ının 5 dakika içinde üretilebildiği ve diğer transkriptlere oranla daha hızlı gerçekleştiğini ortaya koymuştur [56]. miRNA'nın biyogenezi çekirdekte başlayarak sitoplazmada devam eden iki aşamalı bir süreçtir. Çekirdekte gerçekleşen aşamalar miRNA transkripsiyonu, Drosha tarafından nükleer işleme ve nükleositoplazmik dışa aktarma; sitoplazmada gerçekleşen aşamalar ise Dicer tarafından sitoplazmik işleme ve Argonaute (Ago) proteinleri ile RNA kaynaklı susturma kompleksinin (RISC) oluşumundan meydana gelmektedir [57, 58].

#### 2.3.1.1 Kanonik miRNA biyogenezi

##### A) Hücre çekirdeğinde gerçekleşen tepkimeler

##### I) miRNA transkripsiyonu

miRNA genleri, genom boyunca yer alan ve tek transkripsiyonel ürünü miRNA olan kodlamayan genlerdir. miRNA genlerinin tanımlayıcı özelliği, olgun miRNA'nın kök-ilmek yapısında olmasıdır [54]. Bilinen iki RNA polimeraz enzimi (Pol II ve Pol III) arasından miRNA'ların çoğunluğu Pol II tarafından büyük monosistronik veya polisistronik primer miRNA (pri-miRNA) olarak sentezlenir [52, 53, 58]. Tüm pri-miRNA'lar 5' cap (başlık) ve 3' UTR'de (çevrilmemiş bölge) bir poli A kuyruğu içerir [53]. Pri-miRNA tipik olarak protein kodlayan mRNA'lara benzer bir şekilde eklenir, kapatılır ve poliadenile edilir [54].

##### II) Drosha tarafından nükleer işlem

Pri-miRNA'lar, RNA bağlayıcı protein (RBP) olan DiGeorge Sendromu Kritik Bölge Geni 8 (DGCR8) (Pasha) ve endoribonükleaz III (RNase III) enzim ailesine üye olan Drosha'nın görev alması ile 70 nükleotid uzunluğunda kökilmek yapısına bölünerek precursor miRNA (pre-miRNA)'ları oluşturur [52, 58]. Genellikle insanlarda üretilen pri-miRNA'lar 33 baz çiftinden oluşan bir hairpin (saç tokası), bir terminal halkası ve yukarısında ve aşağısında iki tane tek sarmallı yan bölge içerir. Çift iplikli gövde ve eşleştirilmemiş yan bölgeler, DGCR8 bağlanması ve Drosha bölünmesi için önemlidir [59].

Drosha pri-miRNA kesimi sırasında düz bir hat izlenmediği için pre-miRNA'ların 3' ucunda yaklaşık iki nükleotid uzunluğunda çıkıntılı bir yapı (overhang) bulunur [58]. Çekirdek bileşenleri olan DROSHA ve DGCR8'in hücredeki hemen hemen tüm miRNA'ların biyogenezini için gerekli olmasına rağmen, çok sayıda yardımcı faktörün rol oynadığı bilinmektedir [23].

### III) Nükleositoloplazmik dışı aktarma

Pre-miRNA'lar GTP bağlayıcı protein olan Ras ile ilişkili nükleer protein (Ran) (Ran GTP) ve Exportin 5 (XPO5) kullanılarak sitoplazmaya taşınır [52, 58]. Çift sarmallı gövdenin belirli bir uzunlukta olması ve 3' ucunda bulunan iki nükleotidlik çıkıntılar Exportin-5'in bağlanması için önemlidir ve yalnızca doğru işlenmiş pre-miRNA'ların dışı aktarılmasını sağlar [59].

### B) Sitoplazmada gerçekleşen tepkimeler

#### I) Dicer tarafından sitoplazmik işleme

Pre-miRNA'lar sitoplazmaya taşındıktan sonra transaktif edici yanıt (TAR) RNA bağlayıcı protein (Trans-activation response (TAR) RNA binding protein - TRBP) veya interferon kaynaklı protein kinaz PKR'nin bir protein aktivatörü (Protein activator of PKR - PACT) ve RNase III enzim ailesinde yer alan Dicer'in rol aldığı işlemler ile miRNA dubleksi oluşturulur [52, 58]. Dicer aracılı bölünmeden sonra, Dicer ve etkileşimleri TRBP veya PACT, miRNA dupleksinden ayrılır [59].

#### II) Argonaute proteinleri ile RISC oluşturma

Olgun miRNA Argonaute 2 (Ago2) proteinine bağlanır ve Ago2 Dicer'in serbest kalmasına yardımcı olur. Ago2 proteininin bağlandığı iplik kılavuz iplik diğer iplik ise onun antisens tamamlayıcısıdır (miRNA\*). Ago2 bağlanmasından sonra tamamlayıcı iplik yok edilir kılavuz iplik proteinin sentezleneceği mRNA'nın tamamlayıcısıdır. Ago ve kılavuz ipliğin oluşturduğu nükleoprotein kompleksi RISC (RNA-induced silencing protein) adını alır [52, 54, 58, 60]. RISC, miRNA yolunun sitoplazmik efektör aracıdır ve onu hedef mRNA'larına yönlendiren tek sarmallı bir miRNA içerir. Sitoplazmik miRNA işleme ve RISC montajına RISC yükleme kompleksi (RLC) aracılık eder [59]. Olgun miRNA'ların 5' ucundaki 2-8 nükleotidlik çekirdek bölgeleri hedef mRNA'ların 3' UTR'sindeki Watson-



işlenerek RISC'ye yüklenir. Dicer'dan bağımsız yolda mirtronlar Dicer yerine doğrudan Ago2'ye bağlanır ve Ago2 passenger zincirini parçalar. Kalan dizi olgun miRNA'yı elde etmek için geri kırılır (Şekil 2.1). Kanonik olmayan yollar, özellikle Dicer veya Drosha/DGCR8 susturma çalışmalarından elde edilen verileri yorumlarken önemlidir [54].

### 2.3.2 miRNA'ların tanımlanması

Yeni nesil dizileme (Next-Generation Sequencing, NGS) son 15 yıldır hızla gelişen, yüksek verimli DNA dizileme tekniğidir [61, 62]. DNA dizilemesinde ilk olarak Sanger'ın dideoksi sentezi ve Maxam-Gilbert'in kimyasal bölünme yöntemleri kullanılmıştır [62]. NGS, Sanger dizilimine göre; DNA varyasyon spektrumu, küçük baz değişiklikleri, DNA'nın eklenmesi ve çıkarılması, ekzonların veya genlerin delesyonları, inversiyonları ve translokasyonları, yeniden düzenlemeleri gibi daha geniş mutasyon çeşitliliğini tespit eder [63]. NGS, hem gen dizilerinin analizinde hem de RNA'ların ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi için kabul edilen bir yaklaşım olmuştur [64]. miRNA'lar, insan gen düzenlemesinin merkezinde büyük bir role sahiptir, bu nedenle araştırmaların ana hedefleri arasında yer almaktadır [65]. miRNA'ların NGS veri analizindeki temel amaç, kısa dizileri genomla hizalamaktır [24]. 1993'ten beri biyolojik ve biyoinformatik yaklaşımlar *Homo sapiens* ve diğer türlere ait binlerce miRNA keşfedilmiş ve bunlar miRBase veri tabanına depolanmıştır [24, 65]. NGS veri analizlerinde teknolojinin kullanımı ile birlikte yeni miRNA dizilerinin gönderiminde hızlı bir artış olmuştur [24]. 2007 itibariyle miRBase veri tabanındaki toplam miRNA girişi 5 071 olarak bildirilmiştir [66].

*miRNA'ların tanımlanması için gerçekleştirilen analizlerde kullanılan ortak yöntemler:*

- i. miRBase veri tabanından insana ait miRNA dizilerinin korunmuş bölgelerinin seçilerek indirilmesi,
- ii. Elde edilen listeden tekrar dizilerinin silinmesi (singletone yapılması),
- iii. NCBI veri tabanından, çalışılacak genlerin FASTA'larının indirilmesi,
- iv. NCBI Blast programı kullanılarak gene özgü miRNA'ların tespitinin yapılması ve miRNA referans dizilerinin alınması,
- v. Referans dizileri ile gen bölgesi arasındaki yanlış eşleşmelere bakılarak en fazla 7 yanlış eşleşme yapan miRNA dizilerinin alınması,

- vi. RNAhybrid programı ile miRNA ve gen bölgesi arasındaki en uygun hibridizasyonu bulunan miRNA'ların belirlenmesi,
- vii. RNAfold programı ile belirlenen miRNA'ların ikincil yapılarının oluşturulması,
- viii. MEGA programı kullanılarak miRNA'lar arasındaki ilişkiyi gösteren ağaçların çizilmesi,
- ix. Genlerin hücre içi metabolik yollardan hangilerinde rol oynadığının belirlenmesi ile sonuçlanmaktadır.

#### 2.4 SANFH Hastalığı ve miRNA'lar

Çok sayıda araştırma sonucunda elde edilen bulgular ile miRNA'ların SANFH gelişiminde önemli rol oynayabileceği, tanısal belirteçler ve terapötik hedefler olarak hizmet edebileceği gösterilmektedir [67]. Yapılan bir çalışma miR-206'nın aşırı ekspresyonunun, osteoblastların ve osteositlerin fonksiyonunda merkezi rol oynayan ve kemik hücrelerinde bol miktarda bulunan protein olan Cx43'ü hedef alarak kemik oluşumunu baskıladığını kanıtlamıştır. Bu olay kemik kütlesi artışını ve iskelet homeostazisini etkilemektedir [26]. Ayrıca yapılan farklı bir çalışmada miR-206'nın apoptozu indüklediği, osteoblastların çoğalmasını ve farklılaşmasını bastırdığı, SANFH'nin zararlı etkisini hafifletmek için kullanılabilir yeni bir yöntem olabileceği belirtilmiştir [68]. Başka bir çalışmada ise miR-34a'nın *Tgif2*'yi (Transforming büyüme faktörü beta'nın indüklediği faktör homeobox 2) hedefleyerek kemik rezorpsiyonunu ve kemik metastatik nişini düzenlediği, OPG/RANK/RANKL sinyal yolağını düzenleyerek SANFH'yi hafifletebildiği gösterilmiştir [27]. 2019 yılında yapılan bir çalışma, SANFH'nin kemik dokularında miR-20b'nin ekspresyon seviyesini önemli ölçüde artırarak kemik morfogenetik protein (BMP) sinyal yolunu aktive ettiğini bu sayede inflamatuvar faktörlerin salınmasını teşvik ettiğini ve osteosit apoptozuna yol açtığını belirtmiştir [69]. Başka bir çalışmada miR-145'in OPG/RANK/RANKL sinyal yolunu hedef alarak SANFH'de osteoblast proliferasyonunu ve rejenerasyonunu düzenlediğini gösteren kanıtlar bulunmuştur [70]. Fu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada SANFH hastalarında kemik iliğinde miR-596 ekspresyonunun yukarı regüle edildiğini, bunun da osteonekrotik kemiğin çoğalmasını, osteogenik oluşumunu ve onarımını engelleyebileceğini göstermişlerdir. Yapılan başka çalışmalar ise miR-17-5p ve miR-210'un SANFH patogenezi ile ilişkili olduğunu bulmuştur [71]. Farklı çalışmalar miR-146a'nın SANFH ilerlemesinde rol oynadığını kanıtlarken [72], miR-206'nın normal kemik dokusuyla karşılaştırıldığında SANFH'li kemik dokularında

belirgin şekilde yükseldiğini göstermiştir [73]. Başka bir çalışma BMSC'lerdeki miR-122-3p'nin SANFH'nin ilerlemesi ile ilişkili olabileceğini belirtmiştir [74]. Yeni Zelanda beyaz tavşanları üzerinde yapılan bir çalışma sonucunda miR-145'in susturulmasının kemik hücrelerinin apoptozunu inhibe ederek SANFH'nin kemik onarımını desteklediği gösterilmiştir [75]. Son yıllarda miRNA'ların kök hücrelerde gen ekspresyonunun düzenleyicisi olarak rol oynadıkları ortaya çıkmıştır. miR-21, miR-26a ve miR-196 gibi pek çok miRNA'nın osteoblastik farklılaşma sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bazı çalışmalar miR-188 ve miR-194'ün BMSC'lerin osteoblast ve adiposit farklılaşması sırasında düzenleyici olarak rol aldıklarını göstermiştir. Elde edilen bulgular; miR-708'in osteogenik farklılaşmayı inhibe ettiğini, miR-708 sinyallemesinin modülasyonunun steroid tedavisinin kemik kütlesi üzerindeki zararlı etkisini hafifletmek için kullanılabileceğini göstermektedir [76].

**Tablo 2. 4** miRNA'lar ve SANFH üzerindeki etkileri

<b>Bazı miRNA'ların SANFH metabolizması üzerine etkileri</b>
Anjiyogenezi bloke etmek [69, 77]
Osteosit apoptozunu teşvik etmek [68, 69]
Osteoblast ölümünü teşvik etmek [78]
Hücre çoğalması ve osteojenik farklılaşmayı teşvik etmek [68, 79-81]
Adipogenezi baskılamak [82, 83]
Osteogenezi artırmak [77, 82, 83]
Femur başı ON oluşumunu ve gelişimini engellemek [21, 27]
Osteoblast farklılaşmasını engellemek [26, 76, 81, 84-86]
Osteoblastları steroidten korumak [87, 88]
Steroid kaynaklı osteoklast farklılaşmasını baskılamak [89]

Yapılan tüm bu çalışmalar ve daha fazlası SANFH'nin gelişmesi ve ilerlemesinde kodlamayan RNA'ların önemli roller oynadığını göstermektedir (Tablo 2.4). miRNA gibi kodlamayan RNA'ların değişen ifadelerinin SANFH'de etkilediği mekanizmalar ile ilgili verilerin artması durumunda, tanı ve tedavi verimliliğinin de artması beklenmektedir [22].

## 2.5 SANFH ile Bağlantılı Genler

Apoptoz, hasarlı veya enfekte hücreleri ortadan kaldırarak hücre sayısını düzenleyen ve organizmanın homeostazisini kontrol eden temel bir süreçtir [90]. Ancak apoptoz, hastalıkların patolojisine katkıda bulunan tek faktör değildir, liziz ve nekroz gibi düzenlenmiş hücre ölümünün diğer biçimleri de bu süreçte önemli rol oynar [90]. Yapılan

bazı araştırmalar sonucunda nekroptozun, apoptozun yetersiz olduğu koşullar altında aktive edilen, dñzenlenmiř nekrotik hñcre ۆlümünün bir şekli olduğu bulunmuştur [91].

Tez alışmamda; SANFH ile ilgili olan OPG (Osteoprotogerin), RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B = Nñkleer Faktör Kappa-B'nin Reseptör Aktivatörü) RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand = Nñkleer Faktör Kappa-B Ligandının Reseptör Aktivatörü), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor = Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü), RIPK1 (Receptor-İnteracting Serine/Threonine-Protein Kinase 1 = Reseptörle Etkileşime Giren Serin/Treonin Protein Kinaz 1), MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase = Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz), AKT (Protein Kinase B = Protein Kinaz B) (PKB) genleri üzerine araştırmalar yapıldı. SANFH ile ilişkili genlerin seçiminde aşağıda belirtilen kriterler dikkate alınarak RIPK1 ve MAPK genleri ile araştırmalara devam edildi.

- i. RIPK1 geninin apoptoz ve nekroptoz üzerinde etkili olması,
- ii. MAPK geninin MSC'lerin osteogenezinde öneli rol oynaması,
- iii. RIPK1 ve MAPK genleri ile SANFH arasındaki ilişkiyi inceleyen az sayıda çalışmanın bulunması,
- iv. Steroid uygulamalarının bu genlerin etkilediği yolaklar üzerinde etkili olması, nedeniyle genlerin SANFH ile ilişkisini belirlemek için miRNA dizileri kullanıldı.

### **2.5.1 RIPK1 (Reseptörle etkileşime giren serin/treonin protein kinaz 1)**

RIPK1, çok çeşitli nörodejeneratif, otoimmñn ve inflamatuvar hastalıkların tedavisi için umut verici terapötik bir hedeftir, apoptotik ve nekrotik hñcre ۆlümünün yanı sıra inflamatuvar yollarda önemli olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir [90]. Ichiseki ve ark. tavşan modeli üzerinde yaptıkları bir araştırmada steroid uygulamasının, RIPK1 ve RIPK3'ün aktivasyonu yoluyla nekroptoz programını etkilediğini göstermiştir [91]. RIPK1 aktivasyonunun inhibisyonu iskemik hasara karşı korumada oldukça etkilidir [92]. RIPK1, kaspaz aktivasyonunu tetikleyerek RIPK1'e bağımlı apoptoza yol açarken kaspaz aktivitesinin yetersiz olduğu durumlarda RIPK1 nekroptoza yol açmaktadır [93].

### **2.5.2 MAPK (Mitojenle aktifleşen protein kinaz)**

MAPK sinyal yolu elemanları, ökaryotik hñcrelerde sık karşılaşılan bileşenlerdir ve hñcre dışı sinyallerini çok çeşitli hücrenel tepkilere dönüştüren protein Ser/Thr kinazlardır [94, 95]. Embriyogenezde, hñcre farklılaşmasında, hñcre proliferasyonunda, gen

ifadesinde, hücresel tepkilerin kontrol edilmesinde ve apoptozun düzenlenmesinde görev alan bir düzineden fazla MAPK enzimi vardır [95, 96]. Bu nedenle birçok hastalıkla ilgili araştırmalarda incelenmektedirler [97]. Yapılan çalışmalar, MAPK sinyal yolunun, MSC'lerin osteogenezinde önemli rol oynayabileceğini göstermiştir [94].

Yaptığım tez çalışmasında; *in siliko* yöntemler kullanılarak SANFH ile ilgili RIPK1 ve MAPK genlerine ait miRNA dizilerini belirledikten ve bu diziler arasındaki ilişki incelendikten sonra RIPK1 geni için miR-6891 ve MAPK geni için miR-5699 RT-qPCR analizlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Biyoinformatik (*İn siliko*) Çalışmalar

Moleküler tıp alanında son dönemlerde bilişim teknolojilerinin etkisiyle meydana gelen gelişmeler bilgiyi daha kolay ulaşılabilir hale getirmektedir. Bu sayede biyolojik parametreler ve genetik hastalıklar genetik materyalin dizilenmesi yoluyla incelenebilmektedir. Yapılan genomik çalışmalar, çeşitli genetik hastalıkların moleküler mekanizmalarını anlamamıza olanak sağlamaktadır [98].

Bu çalışmada *in siliko* yöntemler kullanılarak SANFH ile ilişkili olan miRNA dizileri tanımlandı. SANFH hastalarındaki miRNA profillerini tespit etmek ve aday biyobelirteçleri tanımlamak için küçük RNA dizilimi kullanıldı [99]. miRNA'ların çoğu olgun dizide yüksek koruma gösterir [60] bu nedenle miRBase (<http://mirbase.org>) veri tabanından insana ait olgun miRNA'lar alındıktan sonra NCBI sitesindeki (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı ile SANFH ile ilişkili olan RIPK1 ve MAPK genlerinin kullanımına karar verildi. RNAhybrid programı ile hedef genleri tanımlandı ve RNAfold programı ile pre-miRNA'ların ikincil yapısı oluşturuldu. MEGA (Moleküler Evrimsel Genetik Analiz - Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı ile miRNA'lar arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik ağaçlar çizildi ve miR-6891 ile miR-5699'nun kullanımına karar verildi. Sonrasında GeneMANIA ve miRTargetLink 2.0 web programı ile KEGG (Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi) ve GO (Gen Ontolojisi) analizleri yapıldı. miRNA dizilemesinin sonuçları RT-qPCR (Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction) yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

##### 3.1.1 Olgun miRNA'ların miRBase'den alınması

miRBase, olgun miRNA'ların alınabilmesi, isimlendirilmesi, dizi verilerinin elde edilmesi, açıklama ve hedef tahmini yapılması için ilk sırada başvurulabilecek, merkezi çevrimiçi veri tabanı kaynağıdır [100]. Bu nedenle miRBase çevrimiçi veri tabanı sayfası açılarak buradan insana ait olgun miRNA'lar alındı ve listede yer alan tekrarlayan diziler bulunarak silindi. Böylece singleton miRNA dizileri elde edildi.

### 3.1.2 miRNA'lar ile gen dizilerinin karşılaştırılması

Olgun miRNA'ların RIPK1 ve MAPK genleri ile olan dizi benzerliğini (homoloji) aramak için NCBI sitesindeki BLASTn programı kullanıldı [101]. Bu çalışmada aday miRNA'ları belirlemek için kullanılan parametrelerin pek çoğu programda belirtildiği gibi kullanıldı, bazı kriterler ise aşağıdaki gibi değiştirilerek Blast yapıldı.

*Program seçeneği (Program selections): Somewhat similar sequences (blastn)*

*Maksimum hedef dizi (Max target sequences) :1000*

*Beklenen eşik değeri (Expect threshold): 1000*

*Kelimelerin büyüklüğü (Word size): 7*

E değeri (Expect value)  $\leq 1$  ve eşleşme değeri (identities)  $\geq 12$  olan miRNA dizileri seçildi. Daha sonra literatüre uygun olarak, bu olgun miRNA dizileri ile genler arasında en fazla 7 yanlış eşleşme olanları listelendi.

### 3.1.3 miRNA için hedef dizilerin belirlenmesi

RNAhybrid; miRNA ve hedef dizilerin yüklenebildiği, kullanımı kolay bir web arayüzüdür aynı zamanda enerji açısından kendi üzerine katlanan tek bir dizi yerine, iki dizi arasındaki en uygun hibridizasyon bölgesini belirler [102]. RNAhybrid programı sonucu elde edilen dizilerden seçim yapılırken:

- i. mfe (minimum folding energy – minimum katlama enerjisi)  $\leq -20$  kcal/mol olması
- ii. pre-miRNA nükleotitleri karşısında, mRNA dizisi üzerinde boşluk bulunmaması (doğru veya yanlış herhangi bir eşleşme mutlaka olmalı),
- iii. pre-miRNA ile mRNA arasında en fazla 4 nt'lik yanlış eşleşme olması,
- iv. pre-miRNA'nın 5' ucundan başlayarak 1. ve 9. nt'ler arasında en azla 1nt'lik yanlış eşleşme olması,
- v. pre-miRNA'nın 5' ucundan başlayarak 10. ve 11. nt'lerde yanlış eşleşme bulunmaması,
- vi. Herhangi bir bölgede yan yana en fazla 2nt'lik yanlış eşleşme olması,

kriterleri aranmıştır. Eğer bu kriterden herhangi biri uygun değilse diğer kriterlere dikkat edilmeden miRNA dizisi elendi [102].

### 3.1.4 miRNA ikincil yapıların oluşturulması

Minimum serbest enerjiye dayalı varsayılan ikincil yapıyı elde etmek için RNAfold gibi çeşitli algoritmalar kullanılmaktadır [103]. Çalışmamızda bir önceki basamakta yapılan

işlemlerden sonra elde edilen miRNA dizilerinin ikincil yapıları RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) programı kullanılarak belirlendi.

Bu aşamada, daha önceki aşamalarda elde ettiğimiz miRNA dizilerini içeren gen bölgesi alındı ve kriterlere uygun olarak RNAfold programında ikincil yapısı çizildi. İkincil yapının çizimi sırasında aşağıdaki kriterler arandı [104].

- i. MFE (minimum free energy – minimum serbest enerji)  $\leq -18$  kcal/mol olması
- ii. Olgun miRNA'nın ikincil yapının sadece bir kolunda bulunması
- iii. Olgun miRNA'nın bulunduğu bölgede en az 12 Watson-Crick eşleşmesinin bulunması

### 3.1.5 miRNA'lar arasındaki ilişkinin gösterilmesi

MEGA; en uygun yer değiştirme modelini seçmek, evrimsel mesafeleri ve farklılaşma sürelerini tahmin etmek, filogenileri yeniden yapılandırmak, ata dizilerini tahmin etmek, seçilimi test etmek ve hastalık mutasyonlarını teşhis etmek için gerekli yöntemleri içeren çok yönlü bir filogeni görüntüleyicisidir [105]. Bu çalışmada, MEGA programı kullanılarak önceki aşamalar sonucunda elde edilen miRNA'lar arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik ağaçlar çizildi. Bu aşamada parametrelerin çoğu programda belirtildiği gibi kullanılmış olup bazıları da aşağıdaki gibi değiştirildi.

*Filogeni Testi (Phlogeny Test)*

*Filogeni Testi (Test of phlogeny): Bootstrap method*

*Bootstrap Çoğaltma Sayısı (No. Of Bootstrap Replications): 10 000*

*Yer Değiştirme Modeli (Substitution Model)*

*Model/Yöntem (Model/Method): p-distance*

*Dahil Edilecek Değişiklikler (Substitutions to Include): d: Transitions + Transversions*

### 3.1.6 Genlerin KEGG ve GO analizleri

KEGG, gen fonksiyonlarını analiz eden, bilgisayar üzerinde hücresel süreçlerle ilgili mevcut genomik bilgiyi fonksiyonel bilgilerle bağlayan, moleküllerin etkileşim ve reaksiyon ağları cinsinden temsil edildiği bir sınıflandırma modeli oluşturan veri tabanıdır [106-108].

SANFH hastalığı genlerine ait (MAPK ve RIPK1) pre-miRNA dizilerinin biyolojik yollarını, hücresel bileşenlerini ve moleküler fonksiyonlarını sınıflandırmak için GO ve KEGG analizleri yapıldı. GeneMANIA programı kullanılarak GO ve KEGG analizleri Song

ve arkadaşları, 2024 yılında yayınlanan makalesi kullanılarak belirlendi [109]. Ayrıca miRTargetLink 2.0 web programı kullanılarak SANFH hastalığı ile ilişkili miRNA hedef genlerin analizlerinde Litwiniuk-Kosmala ve arkadaşlarının 2024 yılında yayınlanan makalesinden faydalanıldı [110].

### 3.2 Periferik Kan Örneklerinin Toplanması

Eylül 2023-Ocak 2024 tarihleri arasında Amasya Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği tarafından, miRNA seviyelerini belirlemek üzere periferik tam kan örnekleri mor kapaklı EDTA'lı tüplerde toplanarak, kontrol grubu (sağlıklı, S1-S15) ve SANFH (hasta, H1-H15) deney grupları hazırlandı (Tablo 3.1). Çalışma kapsamında, 15 SANFH hastası (9 erkek ve 6 kadın) ve 15 sağlıklı olmak üzere (7 erkek ve 8 kadın) (Tablo 3.2) 30 yetişkin bireyden birer tüp kan örneği alındı. Çalışmanın etik olarak uygunluğu Amasya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelendi, 04.05.2023 tarihinde ve 2023/39 onay numarası ile onaylandı. Her katılımcı bilgilendirilmiş onam belgelerini imzaladı.

**Tablo 3. 1** Deney için belirlenen gruplar

DENEY GRUBU	ÖZELLİK
Kontrol grubu (sağlıklı)	SANFH tanısı almamış 15 kişiden kan örnekleri alınmıştır.
SANFH grubu (hasta)	SANFH tanısı almış 15 kişiden kan örnekleri alınmıştır.

**Tablo 3. 2** Kan örnekleri toplanan bireylere ait bazı bilgiler

SAĞLIKLI			SANFH HASTASI		
ÖRNEK NO	CİNSİYET	YAŞ	ÖRNEK NO	CİNSİYET	YAŞ
S1	Kadın	72	H1	Erkek	74
S2	Erkek	66	H2	Erkek	62
S3	Kadın	51	H3	Kadın	59
S4	Erkek	26	H4	Erkek	49
S5	Erkek	52	H5	Erkek	39
S6	Erkek	80	H6	Erkek	59
S7	Erkek	51	H7	Erkek	60
S8	Erkek	85	H8	Erkek	72
S9	Erkek	68	H9	Erkek	43

S10	Kadın	38	H10	Erkek	50
S11	Kadın	33	H11	Kadın	50
S12	Kadın	66	H12	Kadın	62
S13	Kadın	67	H13	Kadın	42
S14	Kadın	67	H14	Kadın	71
S15	Kadın	39	H15	Kadın	53

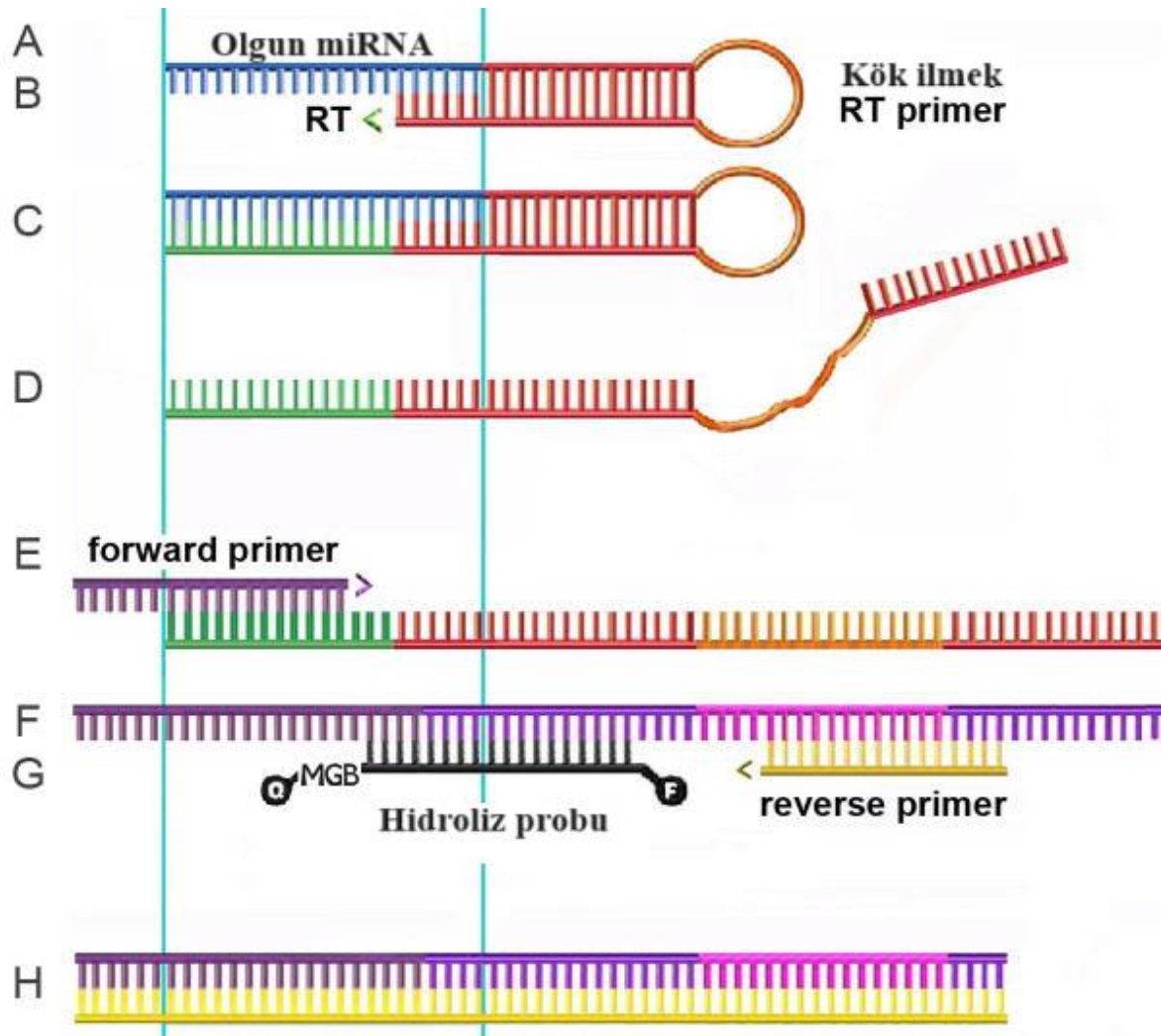
### 3.3 miRNA İzolasyonu

MAPK ve RIPK1 genlerine ait miRNA'ların anlatımlarının belirlenebilmesi için miRNA izolasyonu, "NucleoGene" firmasına ait kit kullanılarak ve protokole uygun olarak yapıldı (Tablo 3.3). miRNA'ların saflığı ve konsantrasyonu nanodrop cihazı (Thermo Fisher Scientific) ile ölçüldükten sonra uygun oranlarda (ng/ $\mu$ L) seyreltilerek tüm örneklerin eşit konsantrasyona sahip olması sağlandı. A260 / A280 = 1.8-3.0 arasında olan miRNA örnekleri çalışmaya dahil edildi.

**Tablo 3. 3** miRNA izolasyon kiti uygulama basamakları

miRNA İzolasyonu	
<b>1. Basamak</b>	150 $\mu$ l tam kan, 400 $\mu$ l Lysis tamponu ve 4 $\mu$ l arttırıcı çözelti (Enhanser) karıştırılarak oda sıcaklığında inkübe edildi.
	14000 $\times$ g'de 2 dk. süre ile santrifüj edildi.
	Süpernatant alınarak yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
<b>2. Basamak</b>	250 $\mu$ l Lysis tamponu ile parçalanmış numune alınarak eşit hacimde etanol ile karıştırıldı (vorteks ile 1 dk. veya pipetleme)
<b>3. Basamak</b>	Karışım toplama tüpündeki spin (döndürme) kolonuna aktarıldı.
	11000 $\times$ g'de 30 saniye süre ile santrifüj edildi.
	Toplama tüpü içinde biriken sıvı boşaltıldı.
<b>4. Basamak (DNaz I uygulaması isteğe bağlı yapılan bir basamaktır)</b>	RNaz free tüpe, 5 $\mu$ l DNaz I ve 45 $\mu$ l DNaz I Buffer karıştırıldı.
	Karışım kolon matrikse eklendi.
	Oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi.
<b>5. Basamak (Bu basamak iki kere uygulandı)</b>	400 $\mu$ l yıkama tamponu I (WBI – Wash Buffer I) spin kolonuna eklendi.
	11000 $\times$ g'de 30 saniye süre ile santrifüj edildi.
	Toplama tüpü içinde biriken sıvı boşaltıldı.

<b>6. Basamak</b>	700µl yıkama tamponu II (WBII – Wash Buffer II) spin kolonuna eklendi. 14000×g'de 1 dk. süre ile santrifüj edildi. Spin kolonu yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
<b>7. Basamak</b>	RNA'yı ayrıştırmak için döndürme kolonunun merkezine 50µl Elüsyon tamponu eklenerek 2 dk. inkübe edildi. 11000×g'de 2 dk. süre ile santrifüj edildi.
<b>8. Basamak</b>	Elde edilen RNA'lar -20°C' saklandı.



Şekil 3. 1 cDNA sentezi ve RTqPZR uygulamalarındaki basamaklar [111]

### 3.4 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

İzolasyonu yapılan tek zincirli miRNA'lar kullanılarak "NucleoGene microRNA cDNA Sentez Kiti" ile kit protokolüne uygun olarak (Thermo Fisher Veriti PCR Thermal Cycler) sentezlendi (Tablo 3.4 ve Tablo 3.5).

**Tablo 3. 4** cDNA sentez prosedürü

BİLEŞEN	HACİM
MicroRNA	9µl
2xReaksiyon Mix	10µl
microRNA Enzim Mix	1µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20µl</b>

**Tablo 3. 5** cDNA sentezi için reaksiyon protokolü

SICAKLIK	SÜRE
37°C	30 dk
50°C	30 dk
70°C	15 dk
4°C	∞

### 3.5 RT-qPZR

RT-qPZR analizleri Roche LightCycler ile yapıldı ve karışımlar Tablo 3.6'da belirtildiği şekilde hazırlandı. miRNA primerlerinin dizaynında forward ve steem loop (kökilmek) RT primer tasarımında Kramer'in (2011) makalesinde belirtilen yöntem kullanıldı [111]. Çalışmamızda MAPK ve RIPK1 genlerinin Standart Reverse primer dizisi olarak Mahmoudivar ve arkadaşlarına ait (2024) makaledeki universal primer dizisi kullanıldı [112]. Olgun miRNA dizisine ait kökilmek ve qPZR forward primerler Adhikari ve arkadaşları tarafından 2013 yılında kullanılan Excel elektronik tablosu ile tasarlandı (miRNAqP-primerdesigntool.xlsx) (Tablo 3.7) [113]. 5S, RIPK1 ve MAPK genlerine ait miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde Tablo 3.8'de ki RT-qPZR amplifikasyon programı uygulandı [114].

**Tablo 3. 6** RT-qPZR’de kullanılan karışımlar

RIPK1 ve MAPK		HOUSEKEEPING (5S)	
KARIŞIM	HACİM	KARIŞIM	HACİM
Syber Green Master Mix (2x)	5µl	Syber Green Master Mix (2x)	5µl
Forward primer ve Stem-Loop (SL) RT primer	1,5 µl	Forward ve Reverse primer	2µl
Standart Reverse primer	1,5 µl	cDNA	2µl
cDNA	2 µl	dSu	1µl

**Tablo 3. 7** RT-qPZR analizlerinde kullanılan primerler

RIPK 1 (miR-6891)	
ACCTCGGCCTTGCCTCCTTTA	
Primer Name	Sequence (5'-3')
RIPK1 (miR-6891)_ Stem-Loop (SL) RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACtaaagg
RIPK 1 (miR-6891)_F	TCGCTacctcggccttgct
Standart Reverse	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA
MAPK (miR-5699)	
GGCCCCACCCAGGAAGGGCATT	
Primer Name	Sequence (5'-3')
MAPK (miR-5699)_ Stem-Loop (SL) RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG GATACGACaatgcc
MAPK (miR-5699)_F	TCGCTggccccaccaggaag
Standart Reverse	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA
5S (HOUSEKEEPING)	
5S-F (forward primer)	GCCATACCACCCTGAACGC
5S-R (reverse primer)	CGGTATTCCCAGGCGGTCT

**Tablo 3. 8** Amplifikasyon programı

Başlangıç denatürasyonu	95°C	10 dakika	} 40 döngü
Denatürasyon	95°C	15 saniye	
Bağlanma	X°C	30 saniye	
Uzama	72°C	30 saniye	
Final uzama	72°C	10 dakika	

RT-qPZR nükleik asitlerin bağıl miktar tayininin değerlendirilmesini sağlar [115]. RT-qPZR verilerini doğru şekilde analiz etmek için belirli denklemlerin oluşturulması, varsayımların kurulması ve bu varsayımların test edilmesi gerekir [116].  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  yöntemi yaygın olarak RT-qPZR deneylerinden belirlenen genlerin ifadesindeki göreceli değişimlerin ölçümü için kullanılır [115, 116].  $C_T$  (Cycle Threshold) değerinin düşük olması, başlangıç hedef dizisinin yüksek miktarda bulunduğu numuneleri gösterir. Düşük  $C_T$  değerine sahip numunelerden en düşük değeri (eşik değeri) geçenler tespit edilir, böylece floresans üretmek için daha az sayıda RT-qPZR döngüsü gerektirir [117].  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  yönteminde hesaplamalar aşağıda belirtilen işlem basamakları ile gerçekleştirildi [114, 116, 118]

Hedef ve referans gen arasındaki döngü eşliğindeki ( $C_T$ ) farkının hesaplanması:

$$\Delta C_T (\text{Test}) = C_T (\text{hedef gen}) - C_T (\text{referans gen})$$

$$\Delta C_T (\text{Kontrol}) = C_T (\text{hedef gen}) - C_T (\text{referans gen})$$

Hedef ve referans örnekleri arasındaki  $\Delta C_T$  farkının hesaplanması:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Test}) - \Delta C_T (\text{Kontrol})$$

Bu yöntemin sonucu,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  referans numunesine göre hedef numunedeki gen ekspresyonunun kat değişimi (Fold change - FC) olarak sunulur [114, 118].

### 3.6 İstatistik

Excell programı ile  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  değerinin hesaplanmasından sonra GraphPad Prism 9 programında kullanılarak Ortalama  $\pm$  standart sapma (Standart Deviation) ve p değeri (p Value) hesaplandı. GraphPad Prism 9'da Mann Whitney U testi uygulanarak yapılan çalışmada  $p < 0,05$  olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Böylece miRNA'ların referansa göre aşağı veya yukarı düzenlendiği gösterildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Biyoinformatik (*In silico*) Çalışmalar

Bu tez çalışmasında, *in silico* yöntemler kullanılarak insanda SANFH ile ilişkili miRNA dizileri ve hedef genleri belirlendi. Olgun miRNA dizileri ile RIPK1 ve MAPK genlerinin dizilerinin karşılaştırılmasında NCBI sitesindeki BLAST programı, hedef genlerinin belirlenmesinde RNAhybrid programı, pre-miRNA'ların ikincil yapılarının belirlenmesinde RNAfold programı, miRNA'lar arasındaki ilişkiyi gösteren ağaçların çizilmesinde MEGA programı, KEGG ve GO analizlerinin yapılmasında GeneMANIA ve miRTargetLink 2.0 web programı kullanıldı.

#### 4.1.1 Olgun miRNA'ların miRBase'den alınması

miRBASE veri tabanından, olgun miRNA dizileri indirildi ve yapılacak analizlerin doğruluğunu etkilememek için aynı dizilerin farklı isimler ile olanları silindi. Singleton işleminden sonra 2630 olgun miRNA dizisi elde edildi.

#### 4.1.2 miRNA'lar ile gen dizilerinin karşılaştırılması

Bu aşamada olgun miRNA'ların RIPK1 ve MAPK genleri ile olan dizi benzerliğini bulmak için NCBI sitesindeki BLASTn programı kullanıldı. E değeri (Expect volue)  $\leq 1$  ve eşleşme değeri (identities)  $\geq 12$  olan miRNA dizileri seçildi. Seçilen miRNA dizileri ile genler arasında en fazla 7 yanlış eşleşme olanları "Base Maching" yazılımı kullanılarak listelendi. Yapılan bu çalışmanın sonucunda RIPK1 geni için yirmi altı miRNA (hsa-miR-329, hsa-miR-30a, hsa-miR-6823, hsa-miR-5700, hsa-miR-624, hsa-miR-3180, hsa-miR-8087, hsa-miR-6891, hsa-miR-519e, hsa-miR-6736, hsa-miR-7156, hsa-miR-1253, hsa-miR-30e, hsa-miR-9900, hsa-miR-4776, hsa-miR-6728, hsa-miR-6765, hsa-miR-7155, hsa-miR-769, hsa-miR-3646, hsa-miR-501, hsa-miR-485, hsa-miR-1285, hsa-miR-23b, hsa-miR-619, hsa-miR-933) (Tablo 4.1), MAPK geni için elli dokuz miRNA (hsa-miR-665, hsa-miR-4763, hsa-miR-766, hsa-miR-4525, hsa-miR-3162, hsa-miR-1207, hsa-miR-6880, hsa-miR-6778, hsa-miR-5699, hsa-miR-4312, hsa-miR-4484, hsa-miR-2277, hsa-miR-328, hsa-miR-1296, hsa-miR-4323, hsa-miR-7106, hsa-miR-6775, hsa-miR-6858, hsa-miR-4498, hsa-miR-6511b, hsa-miR-4514, hsa-miR-7107, hsa-miR-4296, hsa-miR-4640, hsa-let-7e, hsa-miR-6894, hsa-miR-689, hsa-miR-11181, hsa-miR-6735, hsa-miR-6762, hsa-miR-6830, hsa-miR-4749, hsa-miR-6827, hsa-miR-4486, hsa-miR-6730, hsa-miR-3194, hsa-

miR-4316, hsa-miR-1202, hsa-miR-4632, hsa-miR-378a, hsa-miR-7843, hsa-miR-1237, hsa-miR-10398, hsa-miR-4321, hsa-miR-4436b, hsa-miR-4428, hsa-miR-6787, hsa-miR-3620, hsa-miR-4723, hsa-miR-1203, hsa-miR-5787, hsa-miR-4433a, hsa-miR-4290, hsa-miR-6777, hsa-miR-328, hsa-miR-4653, hsa-miR-6749, hsa-miR-4266, hsa-miR-1976) (Tablo 4.2) bir sonraki aşamada kullanılmak üzere seçildi.

**Tablo 4. 1** RIPK1 geni ve miRNA eşleştirilmesi sonuçları

miRNA	YANLIŞ EŞLEŞME	E DEĞERİ	EŞLEŞME DEĞERİ
hsa-miR-329	GAGGAGTCCTGGTTGCTCCTTC	0,69	14/16(88%)
hsa-miR-30a	AGAGAAGTCGGATGTGTACAGC	0,19	15/17(88%)
hsa-miR-6823	TGGTTTGCTCCTTCCCTGGAG	0,66	14/16(88%)
hsa-miR-5700	TAATTTTGGAAATCATTGAAGG	0,68	13/14(93%)
hsa-miR-624	TGCAAGGAATTGGTACTAACC	0,67	14/16(88%)
hsa-miR-3180	CGGTCCTGCGCCTCGGGAG	0,19	14/15(93%)
hsa-miR-8087	AGAGACTTCGTGGATCACAGCTG	0,055	16/18(89%)
hsa-miR-6891	ACCTCGGCCTTGCCCTCTTAA	0,19	14/15(93%)
hsa-miR-519e	AAGTGGTACCATTTGGGCGTT	0,65	13/14(93%)
hsa-miR-6736	TCAGCTCCTTGCCACCAACAG	0,65	17/21(81%)
hsa-miR-7156	TGATGGTCAATCTGGCTGTCCGA	0,19	15/17(88%)
hsa-miR-1253	AGAGAATGAGCCCAGCCTGCA	0,66	17/21(81%)
hsa-miR-30e	AGAGAAGTCGGATGTGTACAGC	0,016	16/17(94%)
hsa-miR-9900	GCAGTTGTGAAGAGAATGCAG	0,19	12/12(100%)
hsa-miR-4776	CAGAACAGCCTGGTTCACCTGCAC	0,19	15/17(88%)
hsa-miR-6728	CAGGGGCACTGTTCTCCCCAG	0,19	15/17(88%)
hsa-miR-6765	CAGAGGGAGGGCGAGAAGGGTGTGG	0,19	18/22(82%)
hsa-miR-7155	TCTGGTGTCTTGGGCTGAT	0,19	14/15(93%)
hsa-miR-769	AGAGACTTCGTGGATCACAGCT	0,68	16/18(89%)
hsa-miR-3646	AGAAGAGAATGAGCCCAGCCTG	0,055	13/13(100%)
hsa-miR-501	TGATCTCTACCCTGGGTGAGA	0,19	12/12(100%)
hsa-miR-485	ATGAGCCTCGGCTCTCCTGTCT	0,66	13/14(93%)

hsa-miR-1285	GGTCTCACTCTGTTGCCAGGC	0,19	14/15(93%)
hsa-miR-23b	TTATTTCCCTGGCATTCTGGTAC	0,66	13/14(93%)
hsa-miR-619	GCTGGGATATCAGGCACTGAGC	0,053	20/23(87%)
hsa-miR-933	CGTAAGCAGGAAGACCTCTTAA	0,69	13/14(93%)

**Tablo 4. 2** MAPK geni ve miRNA eşleştirilmesi sonuçları

miRNA	YANLIŞ EŞLEŞME	E DEĞERİ	EŞLEŞME DEĞERİ
hsa-miR-665	ACTCCGGGGCTGCGGCGCCG	0,61	16/19(84%)
hsa-miR-4763	CGCCTGCCAGCGTTGCTGTT	0,16	12/12(100%)
hsa-miR-766	CTCCCGCTCCCACAGCCTCAGT	0,014	19/21(90%)
hsa-miR-4525	GGGGGGATGTGCTGGCCCCGG	0,17	12/12(100%)
hsa-miR-3162	ACCAAGCCCCTCCTCTCCCCC	0,59	13/14(93%)
hsa-miR-1207	GGGAAGGCAGTCCGGCAGGGA	0,004	18/20(90%)
hsa-miR-6880	TGTGGGTGCCAGAGGCCAGCTC	0,18	12/12(100%)
hsa-miR-6778	ACCACCAGGCCAGGAGGCAGCT	0,61	13/14(93%)
hsa-miR-5699	GGCCCCACCCAGGAAGGGCATT	0,58	16/19(84%)
hsa-miR-4312	GCCTGTGTTCTGATGACA	0,58	13/14(93%)
hsa-miR-4484	ACAAGGCCGCTGTGCCCCCA	0,05	15/16(94%)
hsa-miR-2277	GGCCACACCTCTGCCTGCCTC	0,17	19/22(86%)
hsa-miR-328	CTGGCCCTCTACGCCCTCTTCC	0,17	15/17(88%)
hsa-miR-1296	TTGACTCCTGGCTCAGCCTCC	0,61	13/14(93%)
hsa-miR-4323	CTGCCGCGCATCGTCCGC	0,047	13/13(100%)
hsa-miR-7106	TGTGTGGAGATGTTCTTTGC	0,17	12/12(100%)
hsa-miR-6775	GGGCCTGGTGTCTACCCCAT	0,17	12/12(100%)
hsa-miR-6858	CACCCGGGAGCTGCTCAGCCCC	0,6	14/16(88%)
hsa-miR-4498	TGCACTGCCCGGGCGAGGGCAG	0,57	14/16(88%)
hsa-miR-6511b	CTCCAGGCCAAAGTGCTGCTGATT	0,17	15/17(88%)
hsa-miR-4514	GCGGGCTGCAGTGGCGGA	0,58	13/14(93%)
hsa-miR-7107	GCGGGCTGCAGTGGCGGAAGTG	0,17	15/17(88%)
hsa-miR-4296	CTCCTGGCTCAGCCTCC	0,6	13/14(93%)
hsa-miR-4640	TGGGCCCGGGACGCGCCGGCGGC	0,17	15/17(88%)

hsa-let-7e	CTTCCTGGCCTCCTTCCTTTCC	0,59	14/16(88%)
hsa-miR-6894	AGGCCAGCTCTCCCCTCCAT	0,16	12/12(100%)
hsa-miR-6891	CCCTCTTCCTCTTCTACTTCG	0,16	15/17(88%)
hsa-miR-11181	AGGAGGAGAAAGTTCCAT	0,17	12/12(100%)
hsa-miR-6735	ACGCCTTTGACTCCTGGCTCAG	0,58	13/14(93%)
hsa-miR-6762	CACTGCCATGGAGCAGCCTGTGT	3,00E-05	19/19(100%)
hsa-miR-6830	GCAAGGCATGCTCCTGGCCATC	0,17	12/12(100%)
hsa-miR-4749	CGCCC GCCCGCCCCGCAGAG	0,58	16/19(84%)
hsa-miR-6827	CCCATCTCTTCTGTGCCTTAG	0,58	14/16(88%)
hsa-miR-4486	GGTGGGCGAGGGCACC	0,013	14/14(100%)
hsa-miR-6730	CCTGGCTCCCCATCTGTCCAC	0,59	16/19(84%)
hsa-miR-3194	AGCCAGACACCAGGAGTCACA	0,18	14/15(93%)
hsa-miR-4316	CCTGAGGCTAGCTTGTC	0,61	13/14(93%)
hsa-miR-1202	GTGCGGGCTGCAGTGGCGGAA	0,17	17/20(85%)
hsa-miR-4632	GAGGGCACCGTGGCTGCCGGTA	0,59	14/16(88%)
hsa-miR-378a	CTCCTGACCCAGGCCTCTGTGG	0,59	14/16(88%)
hsa-miR-7843	TGGGGCCAGCCGTCTTCCTGG	0,17	18/21(86%)
hsa-miR-1237	TACTTCGGCACCGTCCGCGAC	0,58	13/14(93%)
hsa-miR-10398	GTGAGGAGAGTTGGGGCCAG	0,17	14/15(93%)
hsa-miR-4321	CTTCGTGTGGACGGCCCTGCT	0,6	13/14(93%)
hsa-miR-4436b	TGCCCTTCCCCTGGCCTACC	0,59	13/14(93%)
hsa-miR-4428	CGTGGGGACGGGAACATGTGCC	0,17	14/15(93%)
hsa-miR-6787	TGAGGGGGGATGTGCTGGCCC	0,17	17/19(89%)
hsa-miR-3620	CCACCCTGGAGCCTGGGCCAC	0,17	15/17(88%)
hsa-miR-4723	CCCATCTGGCCCTGGCCCAT	0,59	13/14(93%)
hsa-miR-1203	CGCAGAGTCCGGCTGCCGCGC	0,61	13/14(93%)
hsa-miR-5787	GGGCTGCGGCGCCGCCGCC	0,61	14/16(88%)
hsa-miR-4433a	GCAGGAGTGGGGATGTGGGCG	0,56	13/14(93%)
hsa-miR-4290	CCGTCTTCTTTCTTTCTT	0,6	16/19(84%)
hsa-miR-6777	GCAGGGAGACCGGGAGGGGTGGC	0,6	14/16(88%)
hsa-miR-328	TGGAGGGTGGGGGGAGCTCAGTG	0,17	15/17(88%)
hsa-miR-4653	ACTGGGAGCAAGGCTTATGCC	0,17	12/12(100%)

hsa-miR-6749	<b>GACCGCAGCAGCCTCGCCCAG</b>	0,048	18/20(90%)
hsa-miR-4266	<b>CTATGAGGCCTTGGTC</b>	0,58	13/14(93%)
hsa-miR-1976	<b>GCCCCTGCTGCCCGTCCTGT</b>	0,37	14/16(88%)

\*miRNA dizisindeki yanlış eşleşmeler kırmızı renk ile gösterilmiştir.

#### 4.1.3 miRNA için hedef dizilerin belirlenmesi

SANFH hastalığına ait pre-miRNA dizilerinin tanımlanmasından sonra hedef genlerin belirlenmesi için RNAhybrid programları kullanıldı. Bu program sonucunda genler ile miRNA'lar arasındaki uygun hibridizasyon bölgeleri belirlendi. Sonuçta RIPK1 geni için üç miRNA (hsa-miR-6891, hsa-miR-7156, hsa-miR-6728) (Tablo 4.3) ve MAPK geni için yirmi altı miRNA (hsa-miR-3162, hsa-miR-5699, hsa-miR-328, hsa-miR-4323, hsa-miR-7106, hsa-miR-6775, hsa-miR-6858, hsa-miR-4514, hsa-miR-4296, hsa-let-7e, hsa-miR-6894, hsa-miR-4749, hsa-miR-4486, hsa-miR-6730, hsa-miR-3194, hsa-miR-4316, hsa-miR-1202, hsa-miR-1237, hsa-miR-4436b, hsa-miR-3620, hsa-miR-1203, hsa-miR-5787, hsa-miR-4433a, hsa-miR-4290, hsa-miR-4266, hsa-miR-1976) (Tablo 4.4) seçildi, diğerleri literatürde verilen kriterlere uygun olmadığı için elendi.

**Tablo 4. 3** RIPK1 geni ve miRNA'lar arasındaki hibridizasyon bölgeleri

miRNA	MFEI	Hedef genler (RIPK1)
hsa-miR-6891	-33.4	target 5' G UCC UUGCUG G 3' GAGGGAGGC AGGCU GAGG UUUCCUCCG UCCGG CUCC miRNA 3' A U A 5'
hsa-miR-7156	-29.1	target 5' A GAACA GUG GA C 3' UCUGG GGCCAGAU GAU CAUCA AGGCU UCGGUCUA CUG GUAGU miRNA 3' G A 5'
hsa-miR-6728	-31.1	target 5' G U CCGCU A G 3' CUGGG AGG CAGUGUCC CUG GACCC UCU GUCACGGG GAC miRNA 3' C U 5'

**Tablo 4. 4** MAPK geni ve miRNA'lar arasındaki hibridizasyon bölgeleri

miRNA	MFEI	Hedef genler (MAPK)
hsa-miR-3162	-32.8	target 5' G G CCACAC U CU A 3' GGAGG GUGG AG GGGGAG GGG UCUCC CACC UC CCCCUC UCC miRNA 3' A 5'

hsa-miR-5699	-39.3	target 5' C U GGCCA AGAAGU A 3' AUGC CCU UCCUGG GUGGGGCC UACG GGA AGGACC CACCCCGG miRNA 3' U 5'
hsa-miR-328	-31.8	target 5' G CU AG AAUGGUC A 3' GGGAG GGG GUGGGGGG CCAG CCUUC CCC CAUCUCCC GGUC miRNA 3' U G 5'
hsa-miR-4323	-28.0	target 5' C CG AGG A U 3' CC GGC AGUGGGG UG GG CCG UCACCCC AC miRNA 3' A UA G 5'
hsa-miR-7106	-30.8	target 5' U UCA U GC G 3' CCC GGGAGCC CCUGCU CAG GGG UCUUCGG GGACGA GUU miRNA 3' A 5'
hsa-miR-6775	-35.1	target 5' U GGGC G A 3' UGGGG GGAGCA UUGGGCCC ACCCC UCUUGU GUUCCGGG miRNA 3' U A 5'
hsa-miR-6858	-32.3	target 5' U AA UCCGGCAGGGAGACC G 3' GGGGG GGCAG GGGAGGGGUG UUUCC CUGUC CCCUCCCUAC miRNA 3' AC 5'
hsa-miR-4514	-32.9	target 5' C UGGUUU G G 3' UCCCU UCGCCU CCCAGC AGGGG GGUGGA GGGUCG miRNA 3' A 5'
hsa-miR-4296	-33.2	target 5' G A G U 3' GGGG AUGGUCCA AC CCCC UACCGGGGU UG miRNA 3' A G 5'
hsa-let-7e	-34.3	target 5' G CAGUCCGGC A G 3' GGGAAGG AGGGAG CCGGGAGG CCUUUCC UUCCUC GGUCCUUC miRNA 3' C 5'
hsa-miR-6894	-34.2	target 5' C ACC UGGCCACACA A 3' AGGGAG GGGAGGGG GUGGGG UUCCUC UCCUCCCC UACCUC miRNA 3' C 5'
hsa-miR-4749	-36.9	target 5' U CCCU ACCGCUUCUGUUGA U 3' CAGGGC GGGC AGCAGGGGC GUCCUG CCCG UCGUCCCCG miRNA 3' U 5'
hsa-miR-4486	-32.6	target 5' A CUCGCCA UC A 3' GCCAGG UGGGCCU AGG CGGUCC ACCCGGG UCC miRNA 3' G 5'
hsa-miR-6730	-31.9	target 5' G UCC A AGAC A 3' GAAGGCAG GGC GGG CGGG CUUUCGUC CCG CCC GUCC miRNA 3' A UA C 5'
hsa-miR-3194	-35.2	target 5' C AUGG AGCU A 3' GCC GCUCCUGAGGCU UGUC UGG UGAGGACUCCGG ACAG miRNA 3' C G 5'

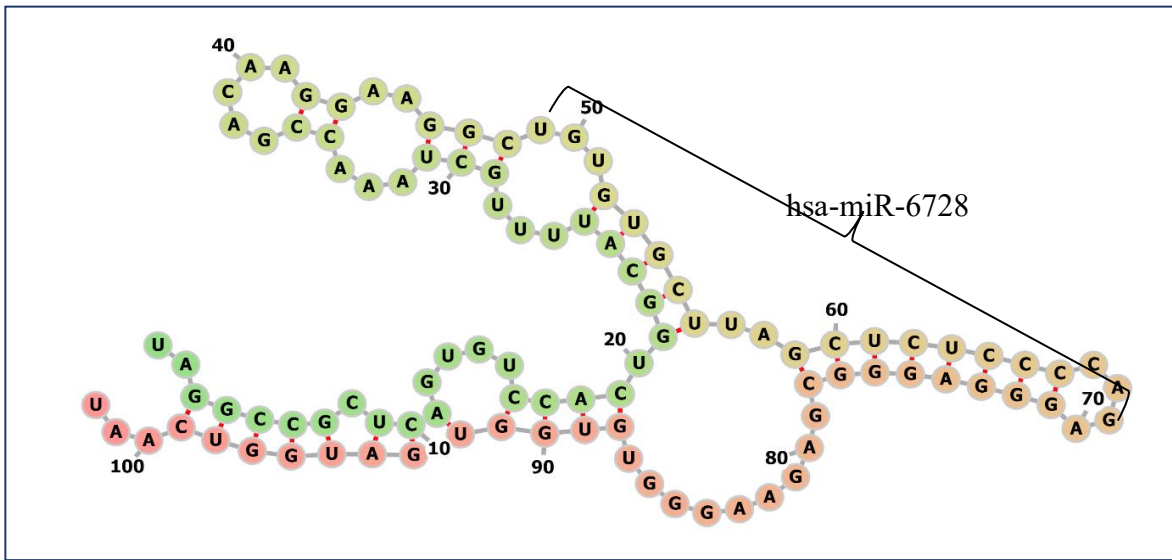
hsa-miR-4316	-27.4	target 5' C UG CC G 3' C A CAGGCCUCUGU G U GUCCGGAGACG miRNA 3' UG AC 5'
hsa-miR-1202	-34.8	target 5' C GG G C G 3' UCCG GCUGCGGC CCGC C AGGC UGACGUCG GGCG G miRNA 3' A GG U 5'
hsa-miR-1237	-34.5	target 5' G AGACC GGCCACACA A 3' CAGGG GGGAGGGGU GUGGGG GUCCC CCUUCCTCCG UACUCC miRNA 3' G 5'
hsa-miR-4436b	-34.7	target 5' G A AGUCCGG AGACC G 3' GG AGGC CAGGG GGGAGGGGU CC UCCG GUCCC CCUUCCTCCG miRNA 3' A U 5'
hsa-miR-3620	-41.8	target 5' U A G CGGG G 3' UGGGCCCA GCU CC AGGGUGG ACCCGGGU CGA GG UCCCACC miRNA 3' C C 5'
hsa-miR-1203	-36.9	target 5' G U A GC A 3' CAG UGGGCCCA GCU CCGGG GUC ACCCGGGU CGA GGUCC miRNA 3' C C 5'
hsa-miR-5787	-43.5	target 5' C AGACUCCGGGGCU CC C 3' GGCGG GCGGCGCCGC GCCC CCGCC CGCCGCGGCG CGGG miRNA 3' U 5'
hsa-miR-4433a	-36.8	target 5' G GCC U CACA C 3' CGCCACAG UC CCCGCUCC GC GCGGGUGU AG GGGUGAGG CG miRNA 3' A 5'
hsa-miR-4290	-32.7	target 5' G GG U G G 3' GUGGG GAGCUCAG G CA CGCCC CUCGGGUC C GU miRNA 3' UU A 5'
hsa-miR-4266	-25.9	target 5' U C U C 3' GACC AGGCCUC GUGG CUGG UCCGGAG UAUC miRNA 3' U 5'
hsa-miR-1976	-37.5	target 5' U CCCU ACCGCUUCUGUUGA U 3' CAGGGC GGGC AGCAGGGGC GUCCUG CCCG UCGUCCCCG miRNA 3' U 5'

#### 4.1.4 miRNA ikincil yapıların oluşturulması

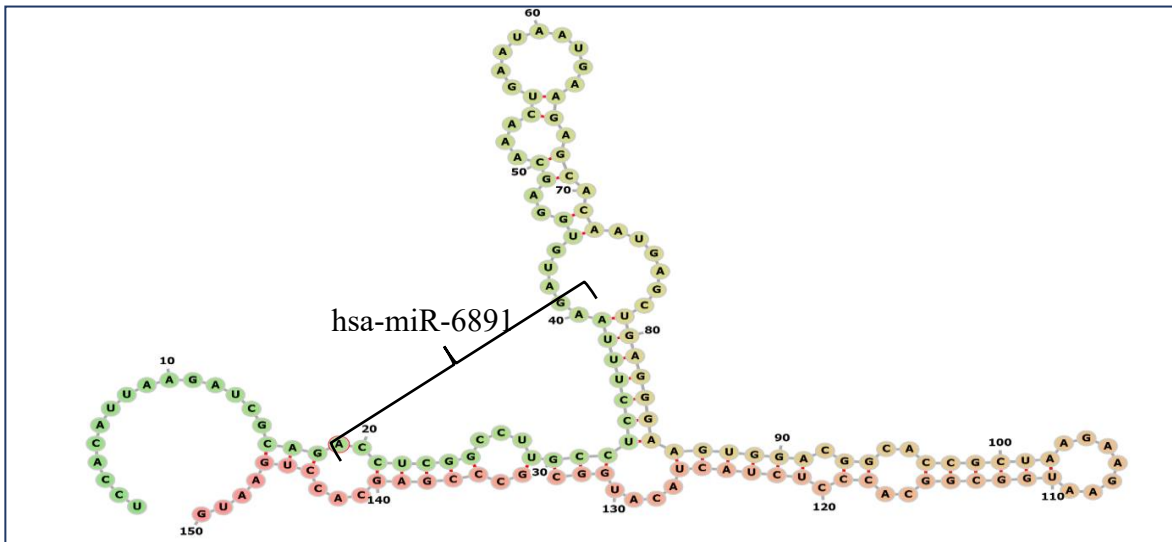
miRNA'ların ikincil yapılarının oluşturulması aşamasında RNAfold programı kullanıldı. Bu aşamada da kriterlere uygun olmayan miRNA'lar elendikten sonra RIPK1 geni ile homoloji gösteren iki adet [hsa-miR-6728 (Şekil 4.1), hsa-miR-6891 Şekil 4.2)] ve MAPK geni ile homoloji gösteren yirmi bir adet [hsa-miR-1202 (Şekil 4.3), hsa-miR-let-7e

(Şekil 4.4), hsa-miR-1203 (Şekil 4.5), hsa-miR-1237 (Şekil 4.6), hsa-miR-1976 (Şekil 4.7), hsa-miR-3194 (Şekil 4.8), hsa-miR-4323 (Şekil 4.9), hsa-miR-4266 (Şekil 4.10), hsa-miR-4290 (Şekil 4.11), hsa-miR-3620 (Şekil 4.12), hsa-miR-4433 (Şekil 4.13), hsa-miR-4436b (Şekil 4.14), hsa-miR-4486 (Şekil 4.15), hsa-miR-4514 (Şekil 4.16), hsa-miR-4749 (Şekil 4.17), hsa-miR-6858 (Şekil 4.18), hsa-miR-5787 (Şekil 4.19), hsa-miR-7106 (Şekil 4.20), hsa-miR-6894 (Şekil 4.21), hsa-miR-6730 (Şekil 4.22), hsa-miR-5699 (Şekil 4.23)] miRNA'nın ikincil yapıları oluşturuldu.

#### 4.1.4.1 RIPK1 geni ile homoloji gösteren miRNA'lar

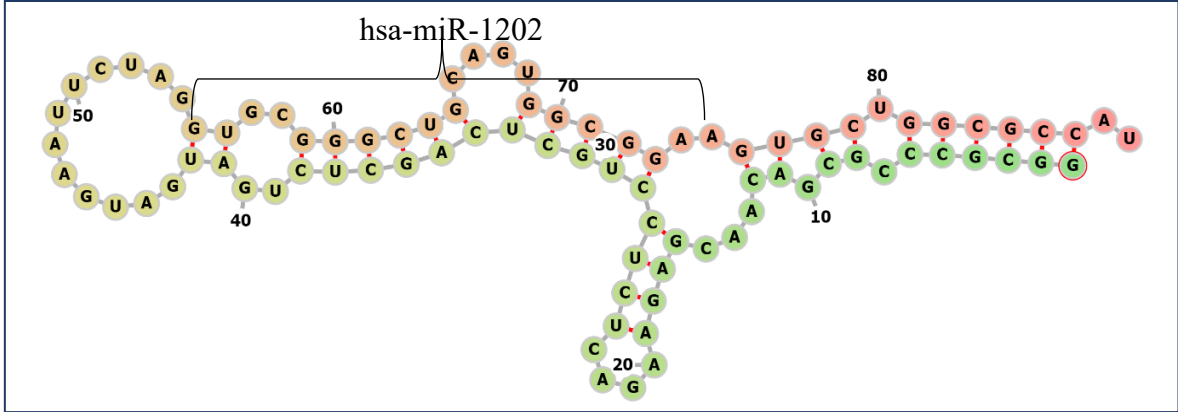


Şekil 4. 1 hsa-miR-6728'in ikincil yapısı

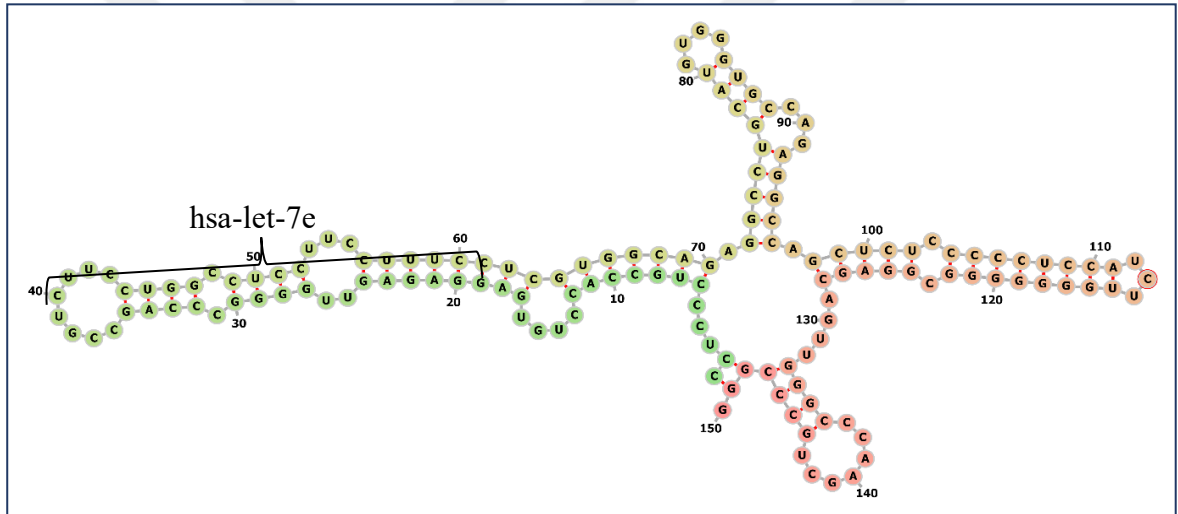


Şekil 4. 2 hsa-miR-6891'in ikincil yapısı

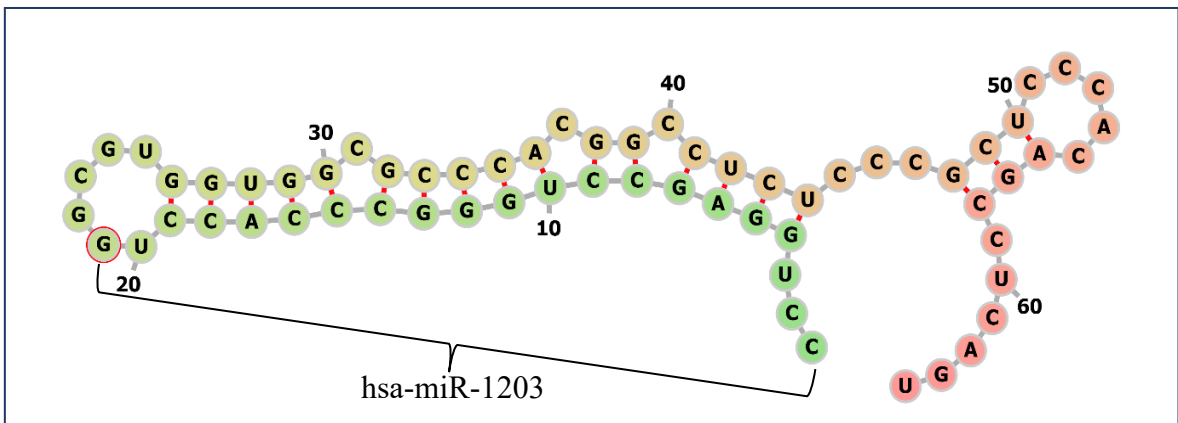
#### 4.1.4.2 MAPK geni ile homoloji gösteren miRNA'lar



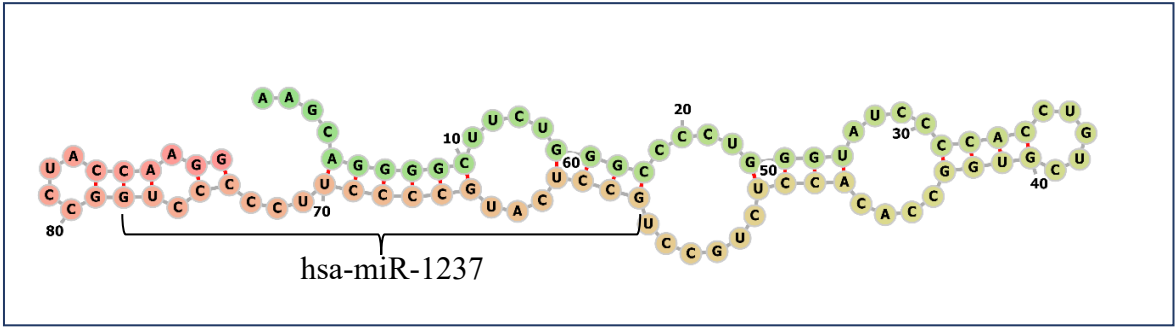
Şekil 4. 3 hsa-miR-1202'nin ikincil yapısı



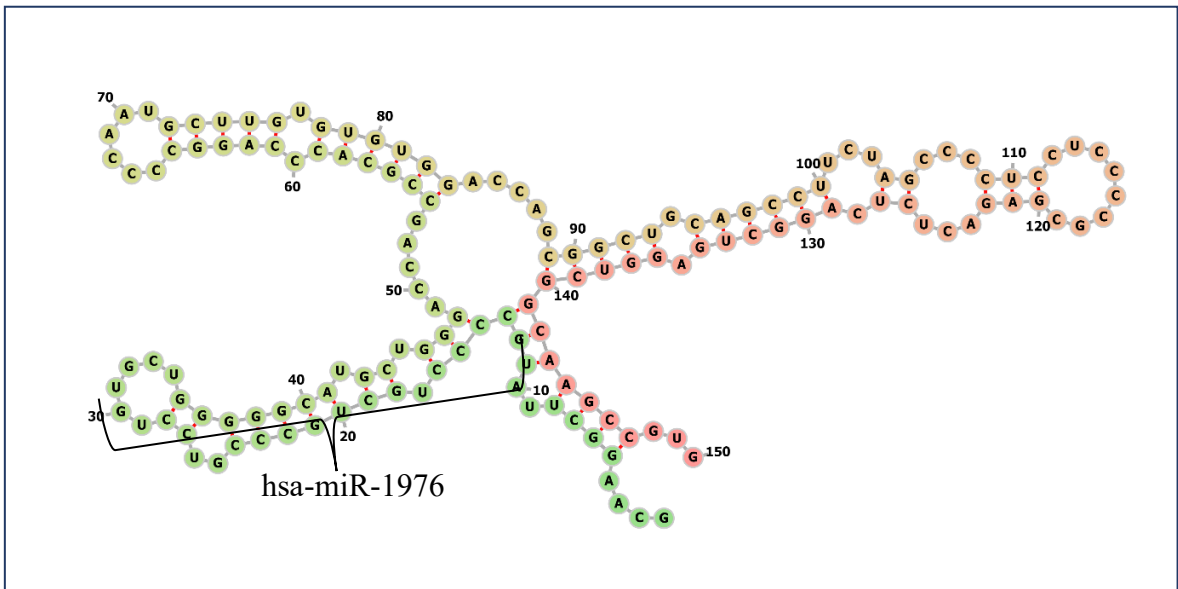
Şekil 4. 4 hsa-miR-let-7e'nin ikincil yapısı



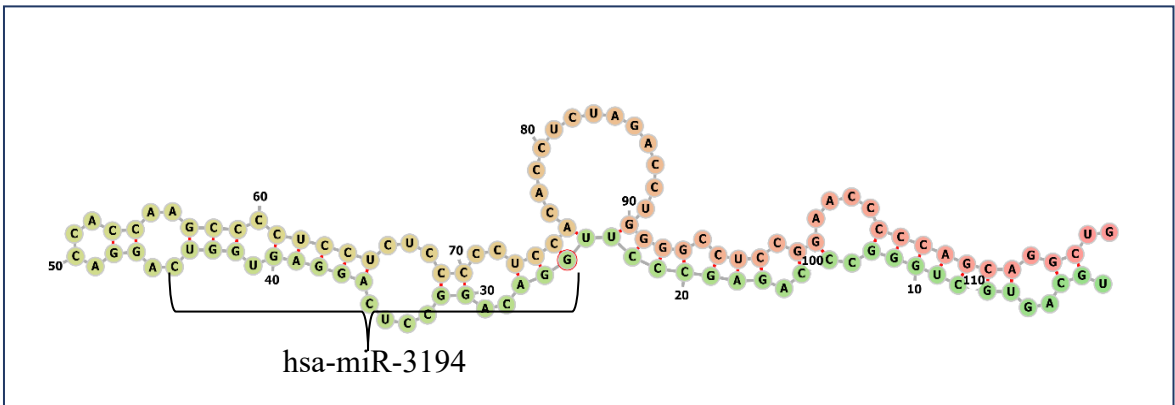
Şekil 4. 5 hsa-miR-1203'ün ikincil yapısı



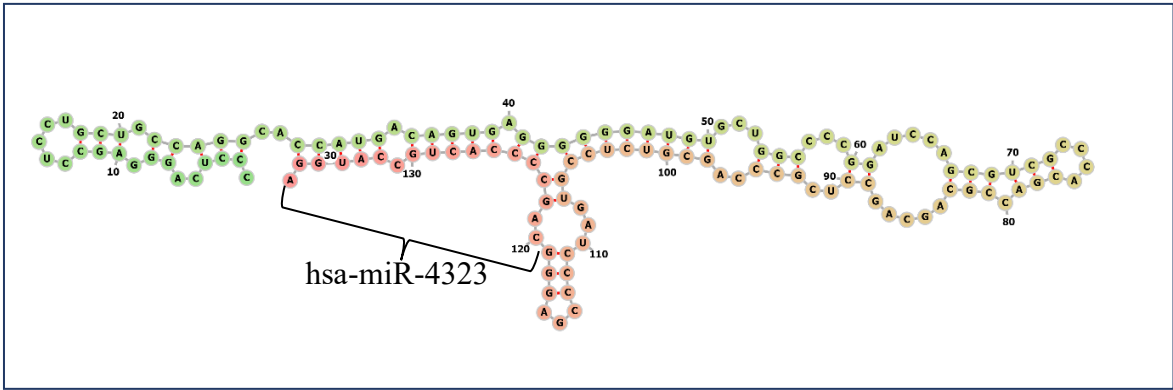
Şekil 4. 6 hsa-miR-1237'nin ikincil yapısı



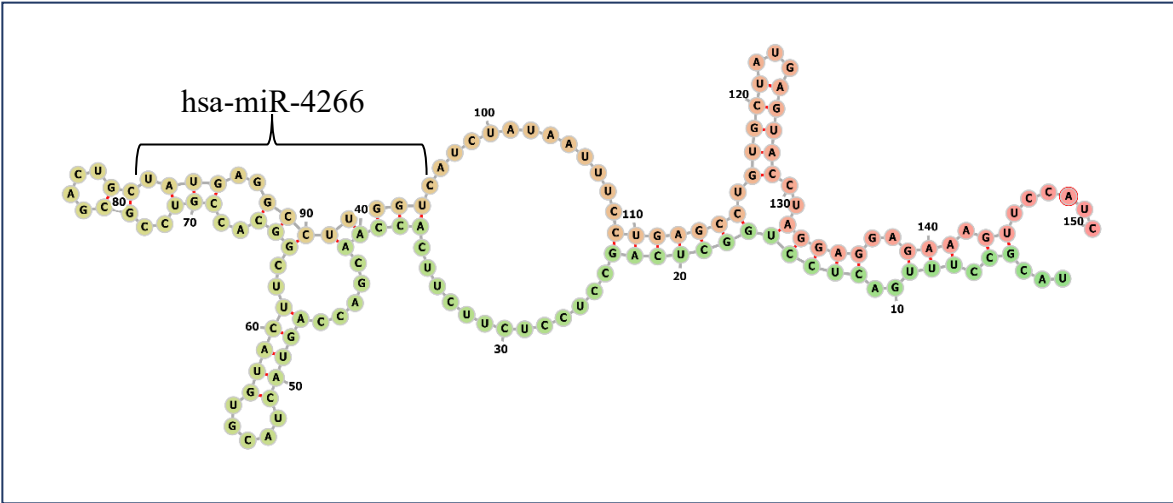
Şekil 4. 7 hsa-miR-1976'nın ikincil yapısı



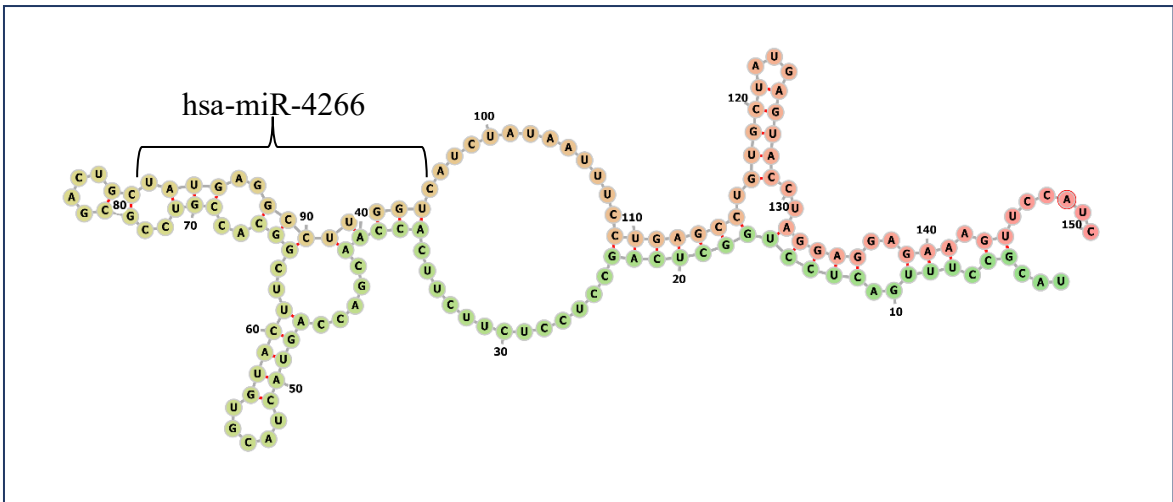
Şekil 4. 8 hsa-miR-3194'ün ikincil yapısı



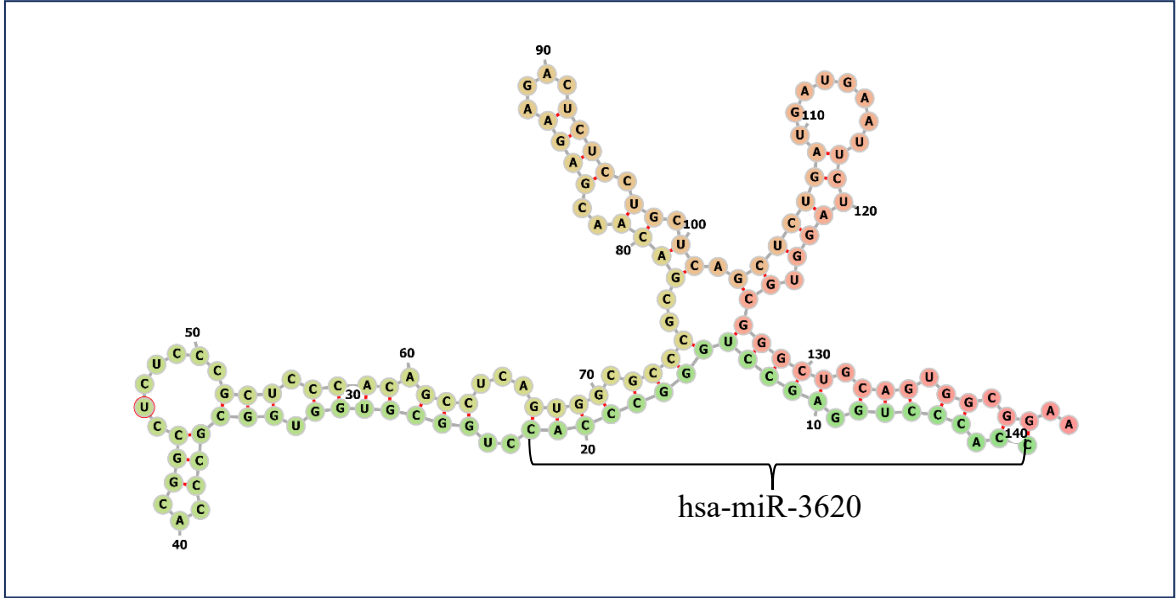
Şekil 4. 9 hsa-miR-4323'ün ikincil yapısı



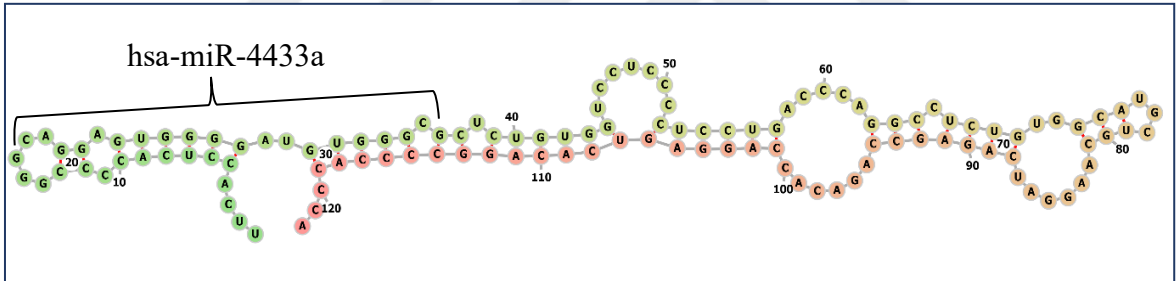
Şekil 4. 10 hsa-miR-4266'nın ikincil yapısı



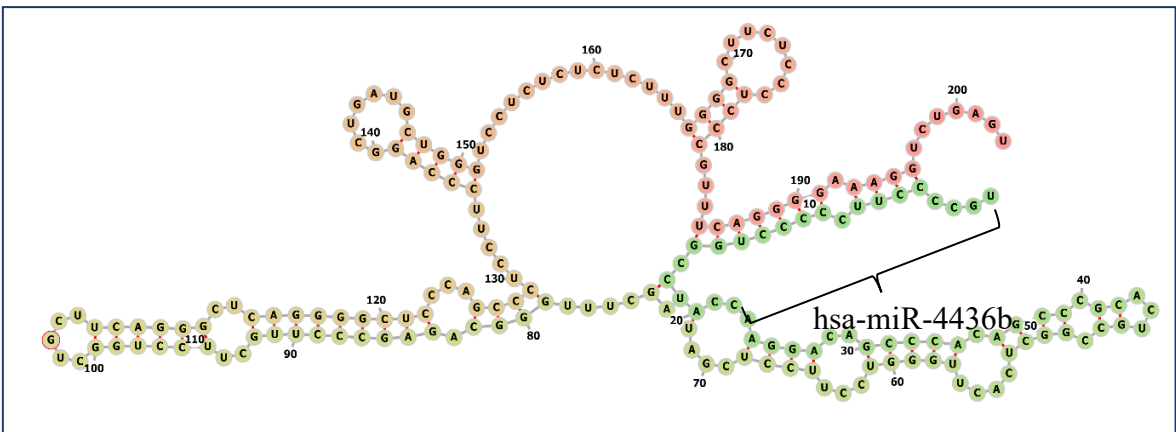
Şekil 4. 11 hsa-miR-4290'ın ikincil yapısı



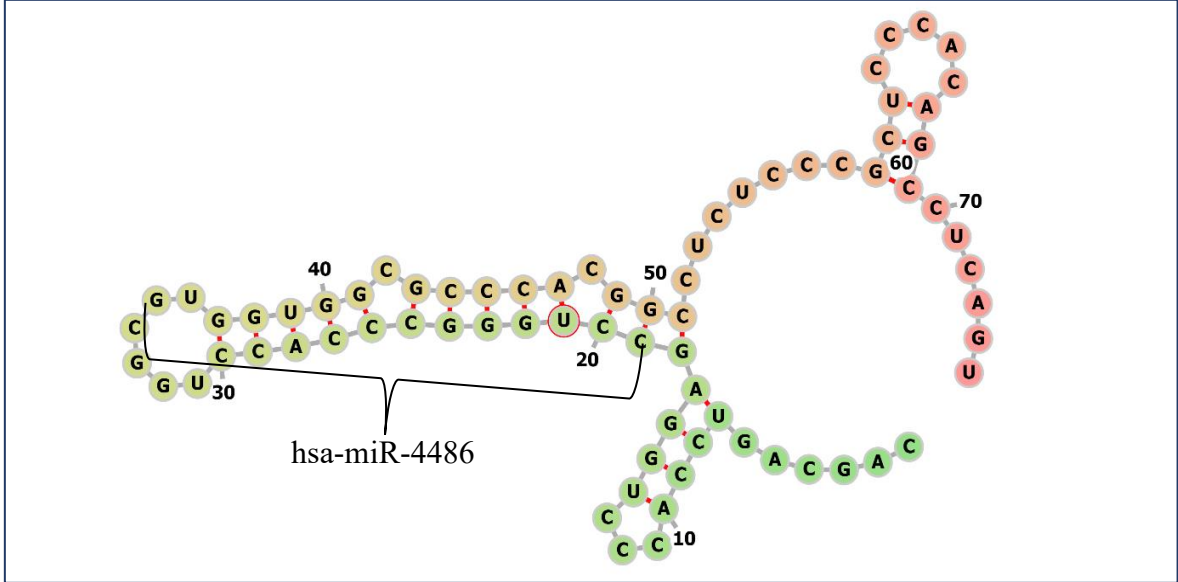
Şekil 4. 12 hsa-miR-3620'nin ikincil yapısı



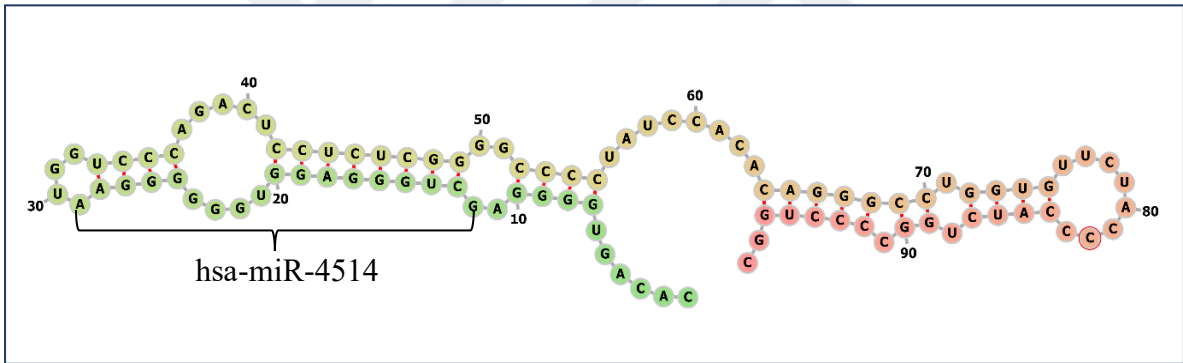
Şekil 4. 13 hsa-miR-4433'ün ikincil yapısı



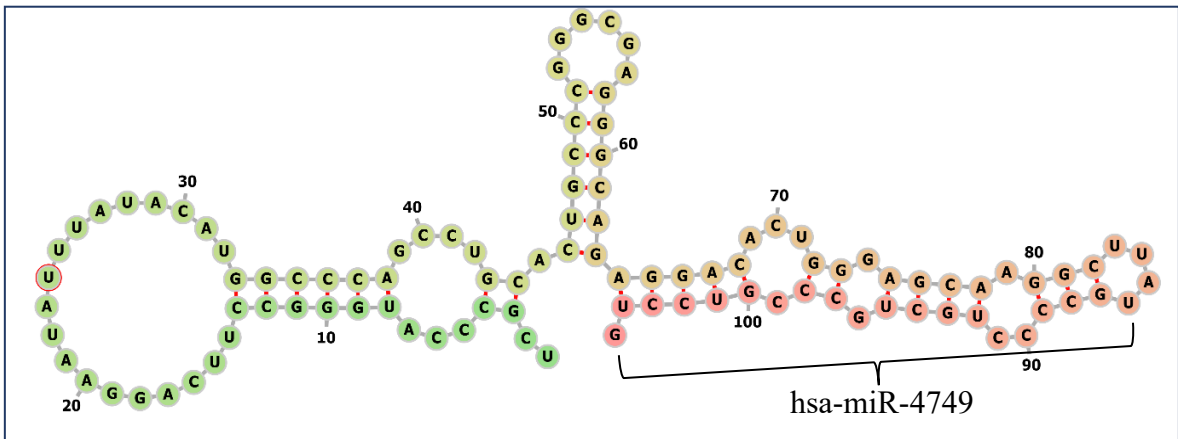
Şekil 4. 14 hsa-miR-4436b'nin ikincil yapısı



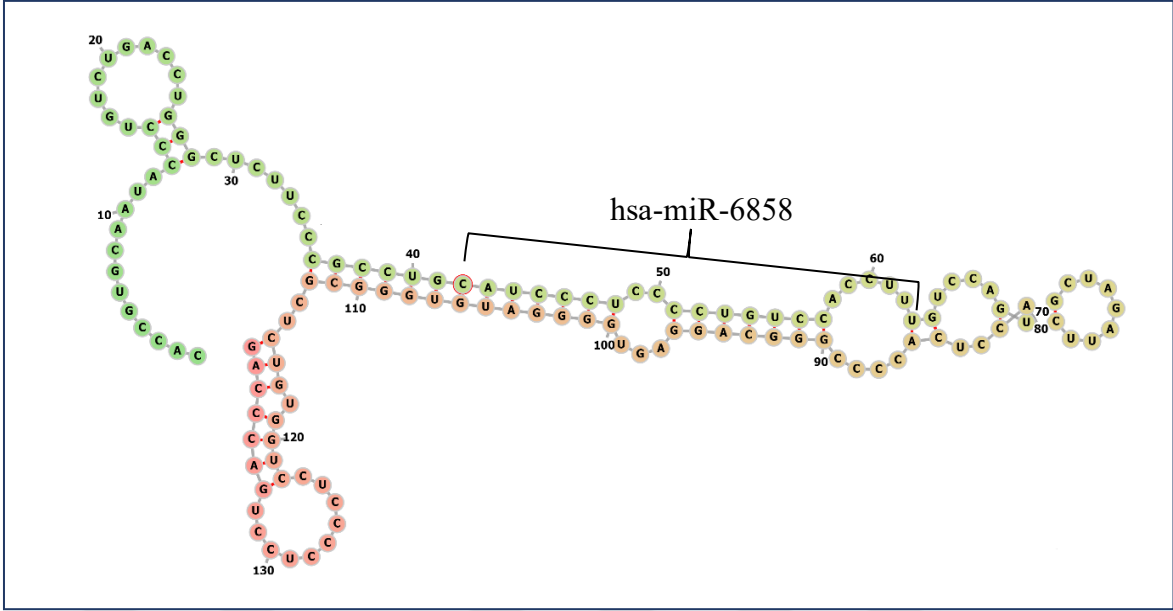
Şekil 4. 15 hsa-miR-4486'nın ikincil yapısı



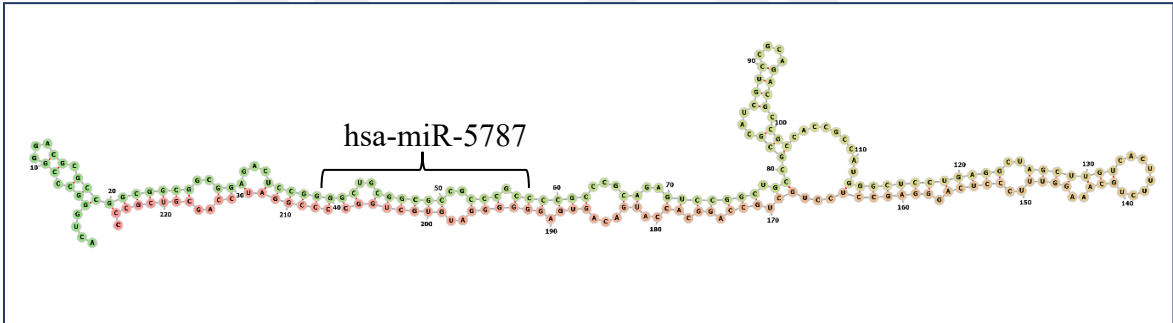
Şekil 4. 16 hsa-miR-4514'ün ikincil yapısı



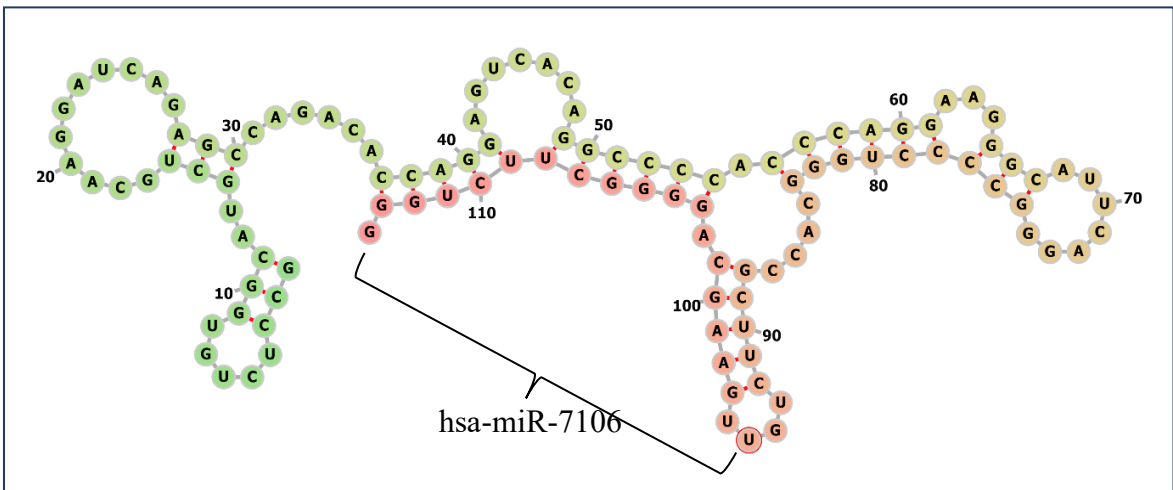
Şekil 4. 17 hsa-miR-4749'un ikincil yapısı



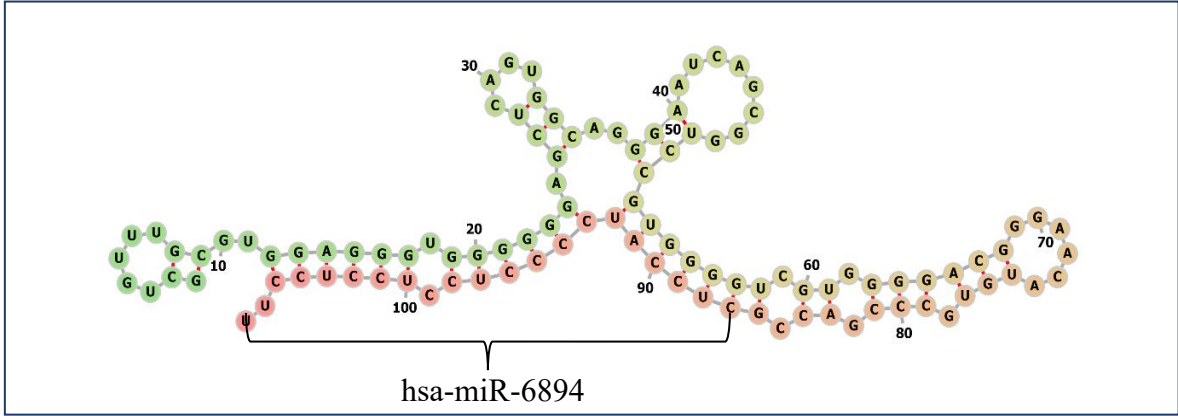
Şekil 4. 18 hsa-miR-6858'in ikincil yapısı



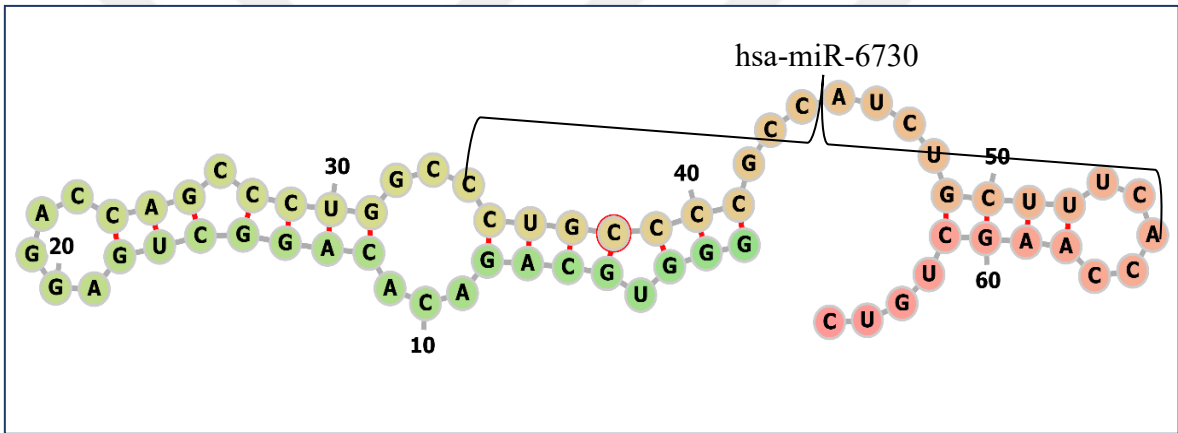
Şekil 4. 19 hsa-miR-5787'nin ikincil yapısı



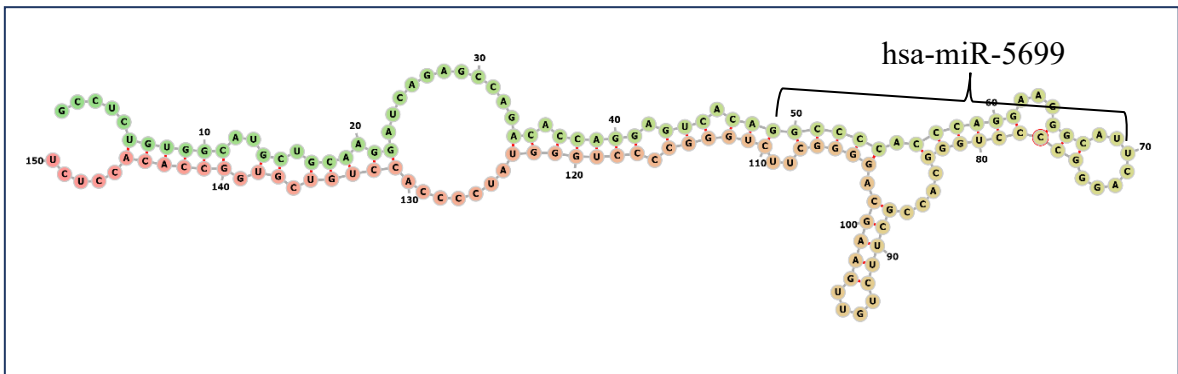
Şekil 4. 20 hsa-miR-7106'nın ikincil yapısı



Şekil 4. 21 hsa-miR-6894'ün ikincil yapısı



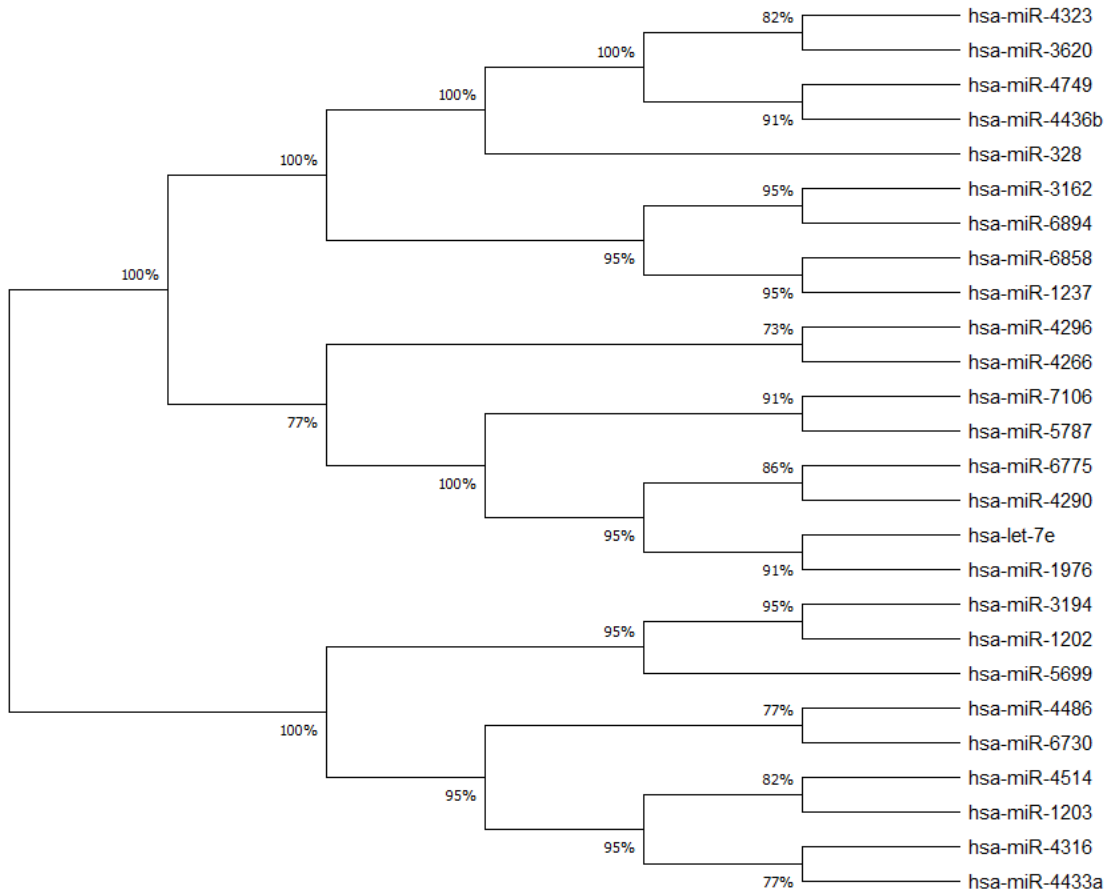
Şekil 4. 22 hsa-miR-6730'un ikincil yapısı



Şekil 4. 23 hsa-miR-5699'un ikincil yapısı

#### 4.1.5 miRNA'lara ait filogenetik ağaçların oluşturulması

Çalışmamızın bu aşamasında MEGA programları kullanılarak önceki aşamalar sonucunda elde edilen miRNA'lar arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik ağaçlar çizildi. RIPK1 geni ile homoloji gösteren iki miRNA elde edildiği için filogenetik ağaç oluşturulamadı. Sadece MAPK geni için elde edilen yirmi bir miRNA arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç çizildi (Şekil 4.24).



Şekil 4. 24 MAPK geni ile miRNA'lar arasındaki ilişkinin gösterimi

MAPK genine ait filogenetik ağaç ilk olarak kendi içerisinde iki ana dala ayrılmıştır. Birinci ana dal kendi içinde iki dala ayrılmıştır. Bu dallardan birincisinde bulunan miRNA'ların; hsa-miR-1976, hsa-let-7e, hsa-miR-4290, hsa-miR-6775, hsa-miR-5787, hsa-miR-7106, hsa-miR-4266, hsa-miR-4296 olduğu ve dallardan ikincisinde bulunan miRNA'ların ise; hsa-miR-1237, hsa-miR-6858, hsa-miR-6894, hsa-miR-3162, hsa-miR-328, hsa-miR-4436b, hsa-miR-4749, hsa-miR-3620, hsa-miR-4323 olduğu görüldü. İkinci ana dalda ise; hsa-miR-3194, hsa-miR-1202, hsa-miR-5699, hsa-miR-4486, hsa-miR-6730, hsa-miR-4514, hsa-miR-1203, hsa-miR-4316, hsa-miR-4433a miRNA'ların olduğu görüldü.

MAPK genine ait filogenetik ağaçta bulunan miRNA'lar arasındaki benzerlik oranları Tablo 4.5'te gösterildiği gibidir.

**Tablo 4. 5** MAPK geninin filogenetik ağacındaki miRNA'ların benzerlik oranları

miRNA'lar	Benzerlik Oranları (%)
hsa-miR-4323, hsa-miR-3620	82
hsa-miR-4749, hsa-miR-4436b	91
(hsa-miR-4323, hsa-miR-3620; hsa-miR-4749, hsa-miR-4436b), hsa-miR-328	100
hsa-miR-3162, hsa-miR-6894	95
hsa-miR-6858, hsa-miR-1237	95
hsa-miR-4296, hsa-miR-4266	73
hsa-miR-7106, hsa-miR-5787	91
hsa-miR-6775, hsa-miR-4290	86
hsa-let-7e, hsa-miR-1976	91
hsa-miR-3194, hsa-miR-1202	95
(hsa-miR-3194, hsa-miR-1202), hsa-miR-5699	95
hsa-miR-4486, hsa-miR-6730	77
hsa-miR-4514, hsa-miR-1203	82
hsa-miR-4316, 4433a	77

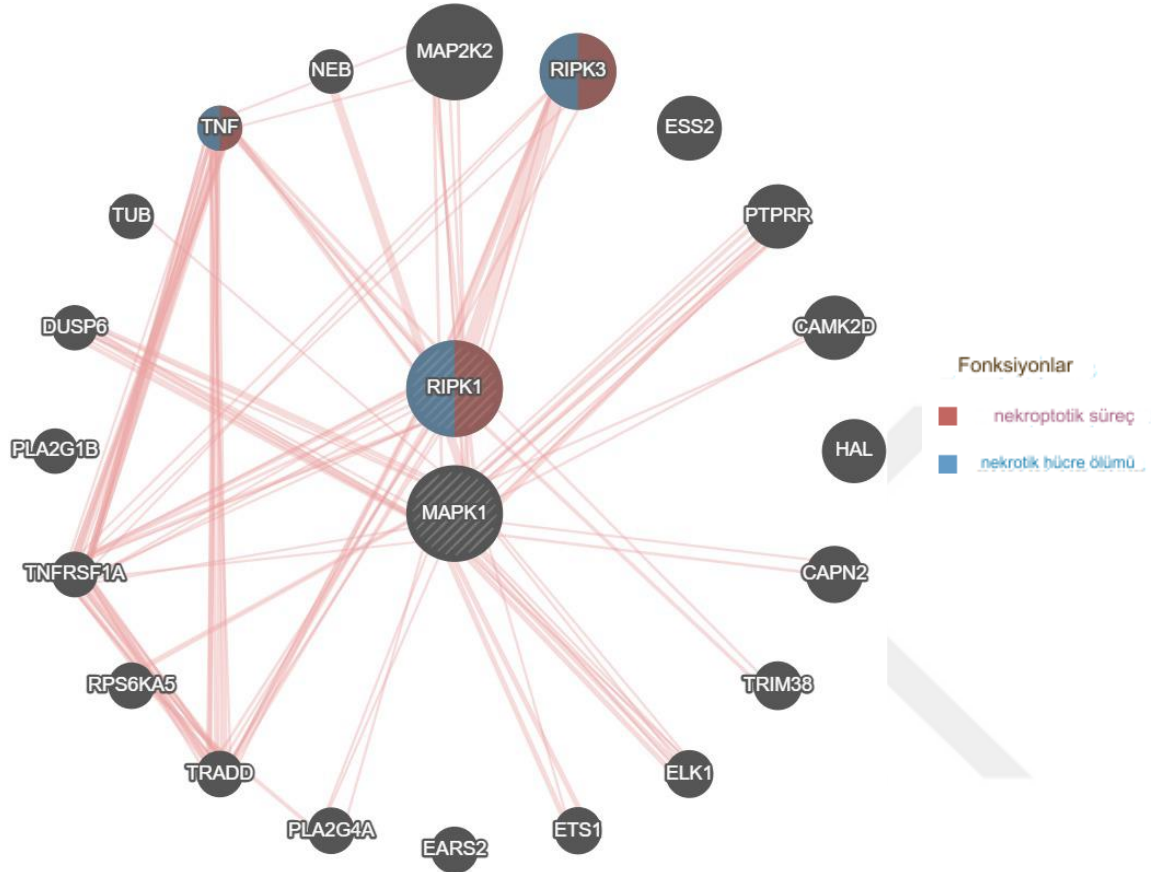
MAPK geni için elde ettiğimiz filogenetik ağacı kullanarak miRNA'lar arasındaki benzerliğin en az olduğu hsa-miR-5699 RT-qPZR analizlerinde kullanılmak üzere primeri tasarlandı. RIPK1 geni için ise elde edilen iki miRNA'dan birisi olan hsa-miR-6891 RT-qPZR analizlerinde kullanılmak üzere primerleri tasarlandı.

#### 4.1.6 Genlerin KEGG ve GO analizleri

SANFH hastalığı genlerine ait (MAPK ve RIPK1) pre-miRNA dizilerinin GO ve KEGG analizleri GeneMANIA ve miRTargetLink web programları kullanılarak yapıldı.

RIPK1 ve MAPK genleri için GeneMANIA programının KEGG ve GO analizleri nekroptotik süreçler ve nekrotik hücre ölümü fonksiyonlarına göre yedi farklı kategoride

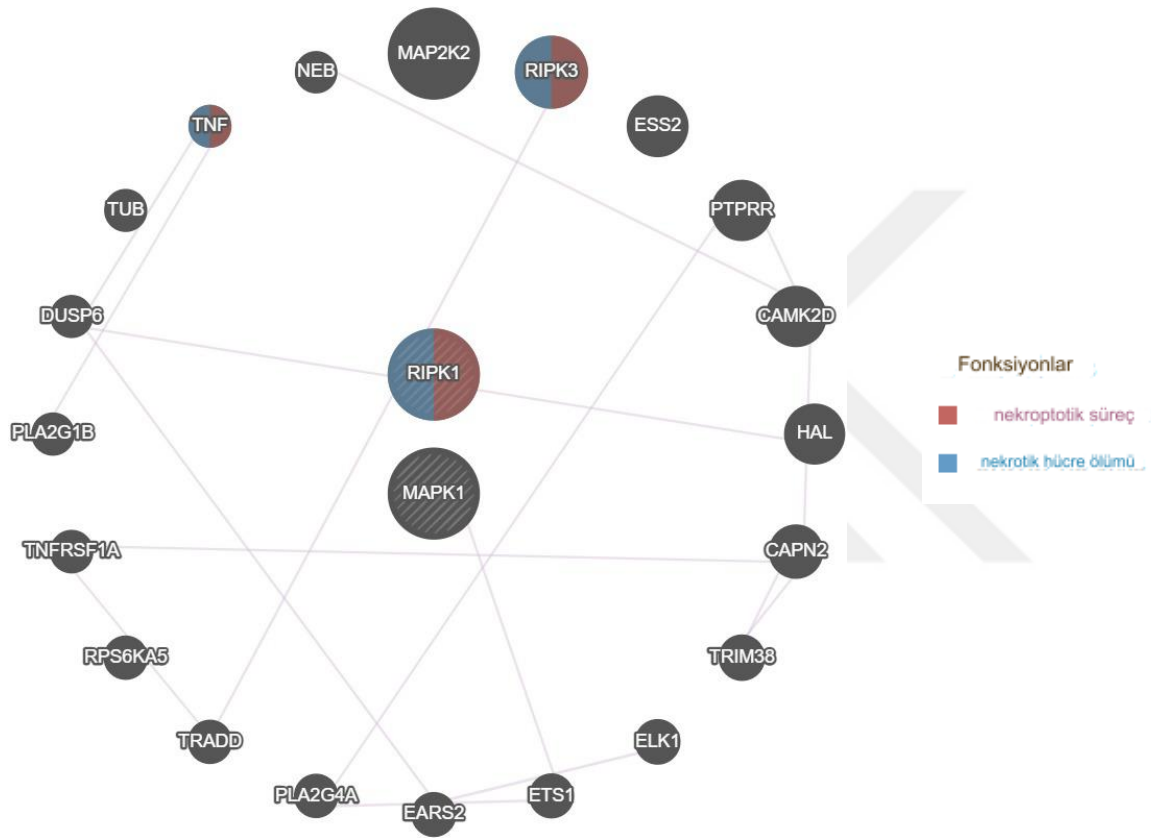
incelendi. Bu kategoriler; fiziksel etkileşimler, ortak ifadeler, tahmin edilen ilişkiler, genetik etkileşimler, ortak lokalizasyonlar, yollar ve paylaştıkları protein alanlarıdır.



**Şekil 4. 25** RIPK1 ve MAPK genlerinin fiziksel etkileşimleri (Physical interactions)

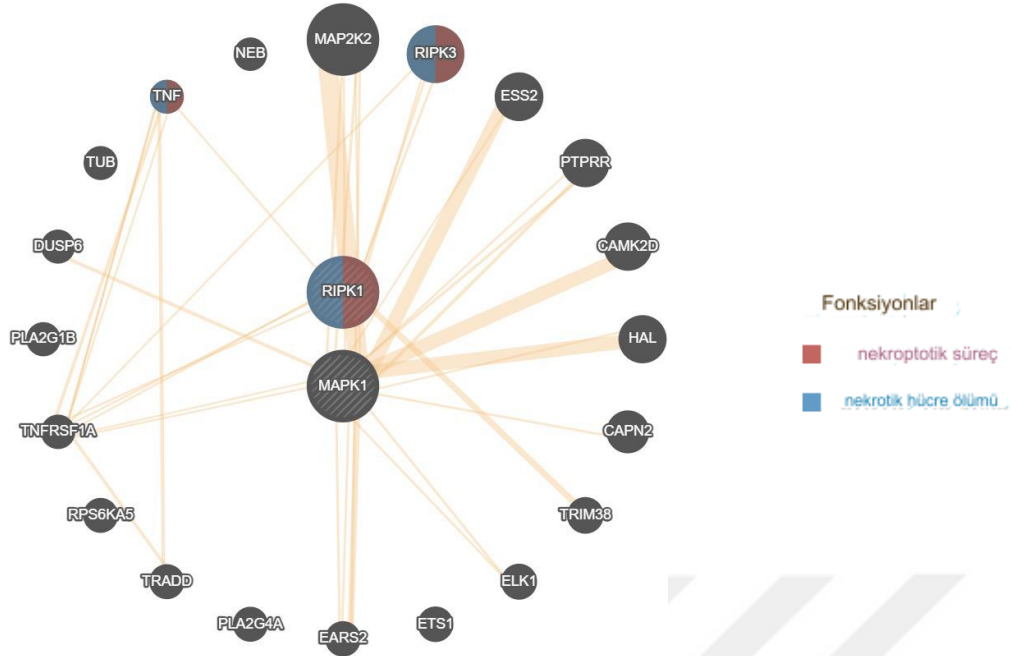
Fiziksel etkileşim kategorisinde RIPK1 ve MAPK genlerinin MAP2K2 (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 2 = Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz Kinaz 2 ), RIPK3 (Receptor-İnteracting Serine/Threonine-Protein Kinase 3 = Reseptörle Etkileşime Giren Serin/Treonin Protein Kinaz 3), PTPRR (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor-Type R = Protein Tirozin Fosfataz Reseptör Tipi R), CAMK2D (Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Type II Delta Chain = Kalsiyum/Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz Tip II Delta Zinciri), CAPN2 (Calpain-2 Catalytic Subunit = Kalpain-2 Katalitik Alt Birimi), TRIM38 (Tripartite Motif Containing 38 = Üçlü Motif İçeren38), ELK1 (ETS Transcription Factor ELK1 = ETS Transkripsiyon Faktörü ELK 1), ETS1 (ETS Proto-Oncogene 1 = ETS Proto-Onkogen 1), PLA2G4A (Phospholipase A2 Group IVA = Fosfolipaz A2 Grubu IVA), TRADD (TNFRSF1A Associated Via Death Domain = Ölüm Alanı Aracılığıyla İlişkili

TNFRSF1A), RPS6KA5 (Ribosomal Protein S6 Kinase A5 = Ribozomal Protein S6 Kinaz A5), TNFRSF1A (TNF Receptor Superfamily Member 1A = TNF Reseptörü Üst Aile Üyesi 1A), PLA2G1B (Phospholipase A2 Group IB = Fosfolipaz A2 Grup IB), DUSP6 (Dual Specificity Phosphatase 6 = Çift Özgüllüklü Fosfataz 6), TUB (TUB Bipartite Transcription Factor = TUB İki Parçalı Transkripsiyon Faktörü), TNF (Tumor Necrosis Factor = Tümör Nekroz Faktörü) ve NEB (Nebulin) genleriyle ilişkisi tespit edilmiştir (Şekil 4.25).



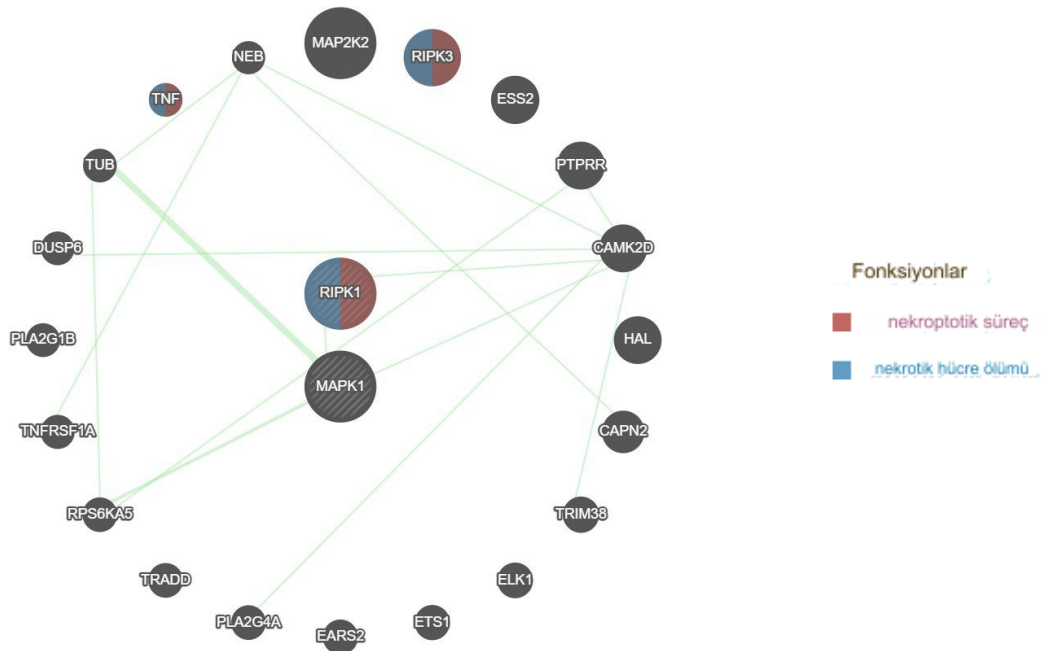
Şekil 4. 26 RIPK1 ve MAPK genlerinin ortak ifadeleri (Co-Expression)

Ortak ifadeleri kategorisinde RIPK1 ve MAPK genlerinin RIPK3, PTPRR, CAMK2D, HAL (Histidine Ammonia-Lyase = Histidin Amonyak-Liyaz), CAPN2, TRIM38, ELK1, ETS1, EARS2 (Glutamyl-tRNA Synthetase 2 = Glutamil-tRNA Sentetaz 2), PLA2G4A, TRADD, RPS6KA5, TNFRSF1A, PLA2G1B, DUSP6, TNF ve NEB genleriyle ilişkisi tespit edildi (Şekil 4.26).



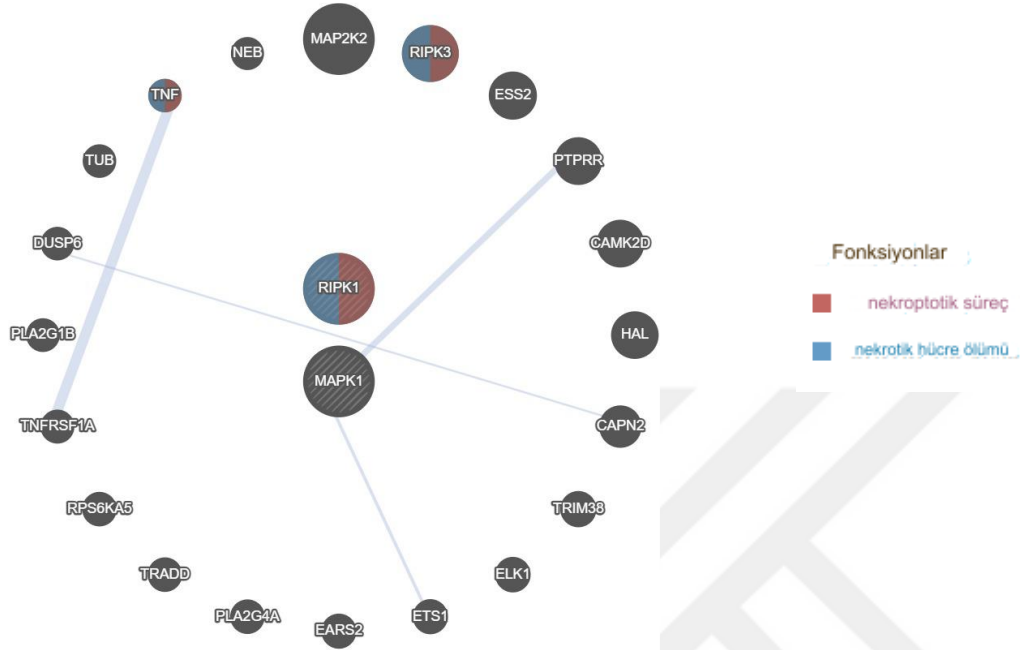
Şekil 4.27 RIPK1 ve MAPK genlerinin tahmin edilen ilişkileri (Predicted)

Tahmin edilen ilişkileri kategorisinde RIPK1 ve MAPK genlerinin MAP2K2, RIPK3, ESS2, PTPRR, CAMK2D, HAL, CAPN2, TRIM38, ELK1, EARS2, TRADD, TNFRSF1A, DUSP6 ve TNF genleriyle ilişkisi tespit edildi (Şekil 4.27).



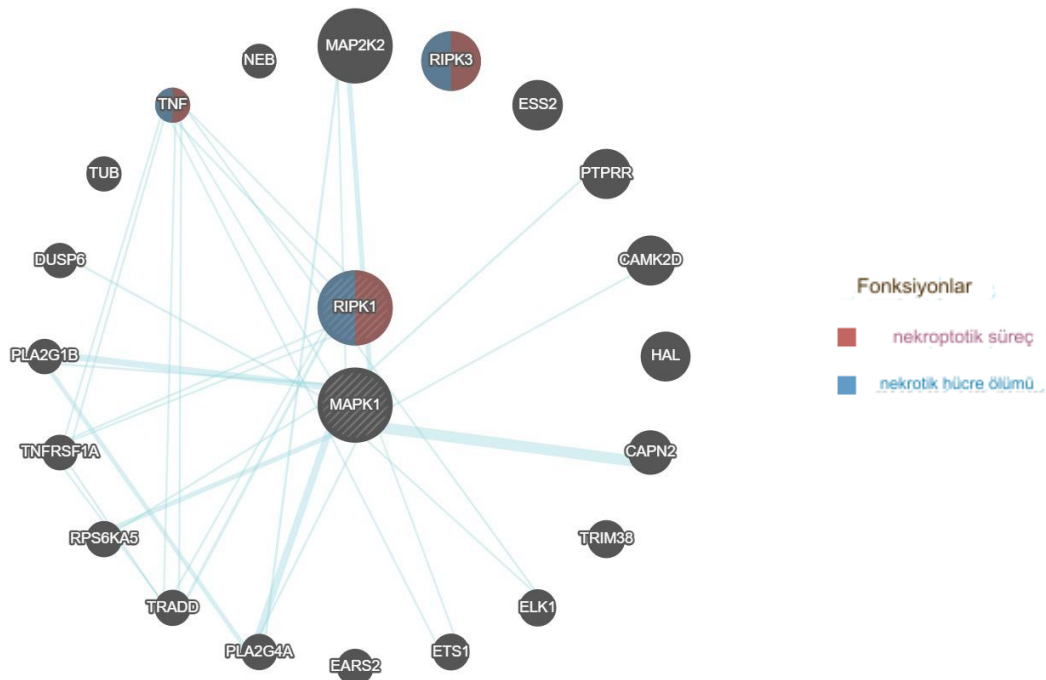
Şekil 4.28 RIPK1 ve MAPK genlerinin genetik etkileşimleri (Genetic interactions)

Genetik etkileşimleri kategorisinde RIPK1 ve MAPK genlerinin PTPRR, CAMK2D, CAPN2, TRIM38, PLA2G4A, RPS6KA5, TNFRSF1A, DUSP6, TUB ve NEB genleriyle ilişkisi tespit edildi (Şekil 4.28).



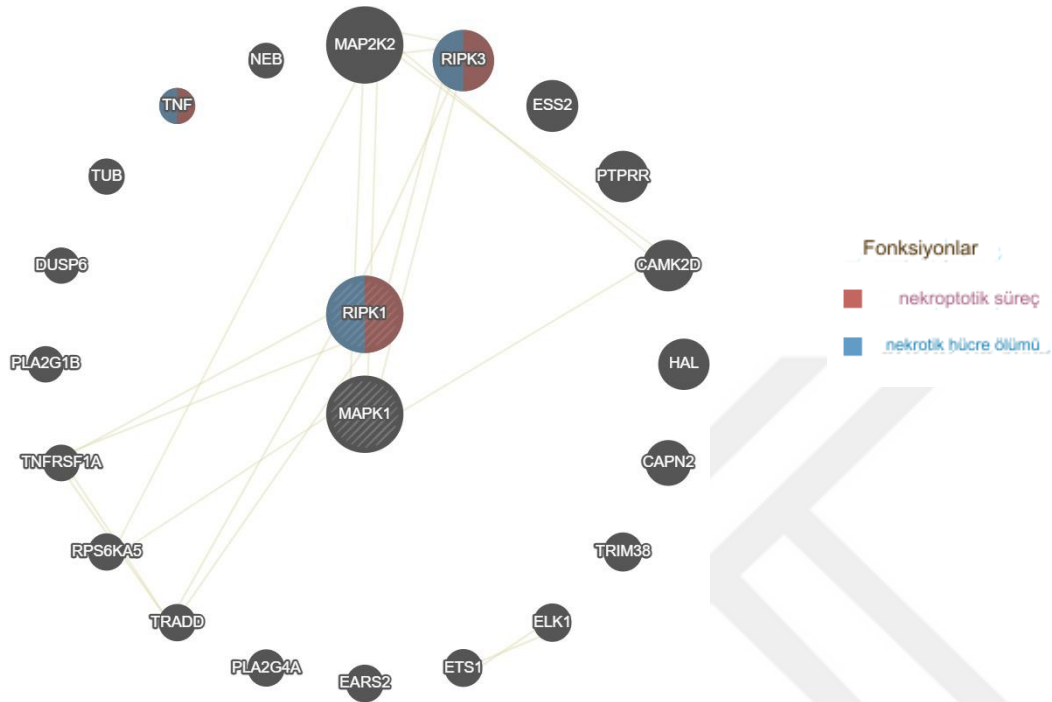
Şekil 4. 29 RIPK1 ve MAPK genlerinin ortak lokalizasyonları (Co Lokalizasyon)

Ortak lokalizasyonları kategorisinde RIPK1 ve MAPK genlerinin PTPRR, CAPN2, ETS1, TNFRSF1A, DUSP6 ve TNF genleriyle ilişkisi tespit edildi (Şekil 4.29).



Şekil 4. 30 RIPK1 ve MAPK genlerinin yolları (Pathway)

Yolaklar kategorisinde RIPK1 ve MAPK genlerinin; MAP2K2, PTPRR, CAMK2D, CAPN2, ELK1, ETS1, PLA2G4A, TRADD, RPS6KA5, TNFRSF1A, PLA2G1B, DUSP6 ve TNF genleriyle ilişkisi tespit edildi (Şekil 4.30).



**Şekil 4. 31** RIPK1 ve MAPK genlerinin paylaştıkları protein alanları (Shared Protein Domains)

Paylaştıkları protein alanları kategorisinde RIPK1 ve MAPK genlerinin; MAP2K2, RIPK3, CAMK2D, ELK1, ETS1, TRADD, RPS6KA5 ve TNFRSF1A genleriyle ilişkisi tespit edildi (Şekil 4.31).

miRTargetLink web programı kullanılarak MAPK geni için yapılan KEGG ve GO analizleri sırasında program kriterleri aşağıda verildiği şekilde değiştirildi.

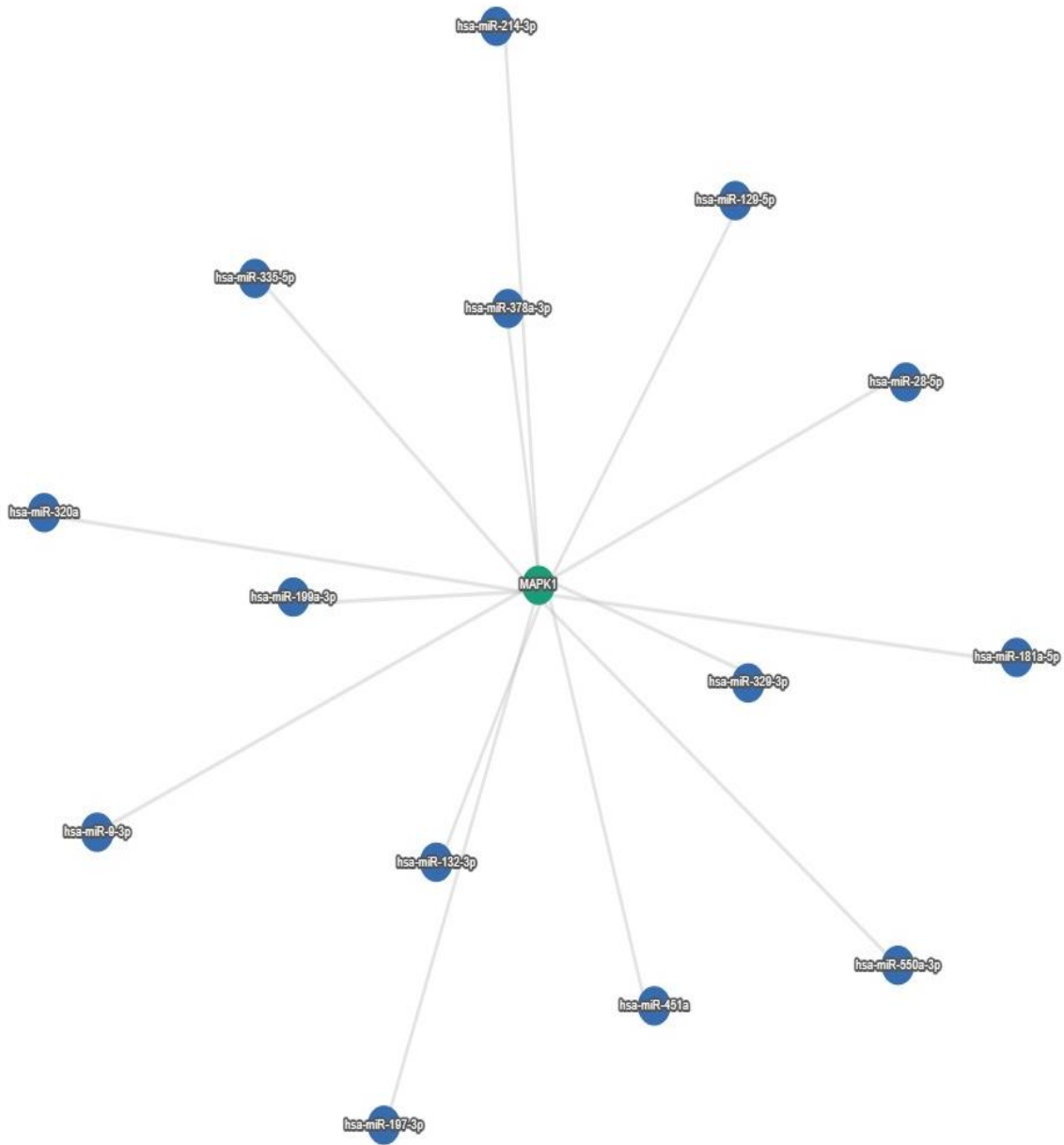
*miRNA Hedefleri (miRNA Targets): Güçlü doğrulanmış (Strong validated)*

*Ağ Düzeni (Network Layout): Fcose*

Analiz sonucuna göre; hsa-miR-214-3p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-378a-3p, 129-5p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-320a, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-329-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-9-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-550a-3p ve hsa-miR-197-3p genleri ile ilişkili olduğu tespit edildi (Şekil 4. 32).

Tez çalışması sırasında yapılan biyoinformatik uygulamalar sonucunda MAPK geninin hsa-miR-1202, hsa-miR-let-7e, hsa-miR-1203, hsa-miR-1237, hsa-miR-1976, hsa-

miR-3194, hsa-miR-4323, hsa-miR-4266, hsa-miR-4290, hsa-miR-3620, hsa-miR-4433, hsa-miR-4436b, hsa-miR-4486, hsa-miR-4514, hsa-miR-4749, hsa-miR-6858, hsa-miR-5787, hsa-miR-7106, hsa-miR-6894, hsa-miR-6730, hsa-miR-5699 genleri ile ilişkili olduğu tespit edildi. miRTargetLink web programı ile elde edilen ve MAPK geni ile ilişkili olan miRNA'lar ve tez çalışmasında bulunan miRNA'lar arasında benzerlik bulunmadığı görüldü. Bu nedenle bulunan miRNA'lar MAPK geni için özgün değere sahiptir.



**Şekil 4. 32** MAPK geni ile bağlantılı olan miRNA'lar

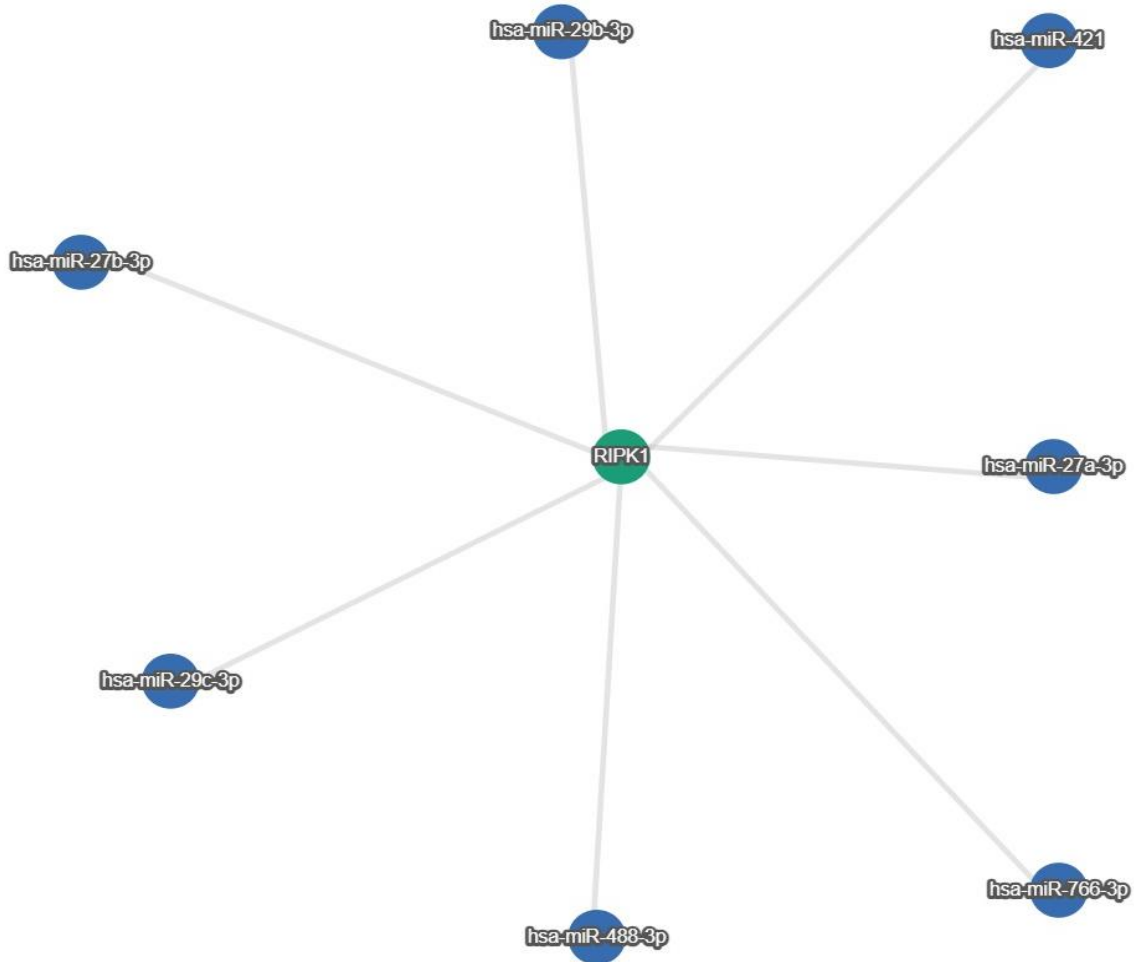
miRTargetLink web programı kullanılarak RIPK1 geni için yapılan KEGG ve GO analizleri sırasında program kriterleri aşağıda verildiği şekilde değiştirildi.

*miRNA Hedefleri (miRNA Targets): Tahmin edilen (Predicted)*

*Ağ Düzeni (Network Layout): Fcose*

Analiz sonucuna göre; hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-421, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-488-3p ve hsa-miR-766-3p genleri ile ilişkili olduğu tespit edildi (Şekil 4. 33).

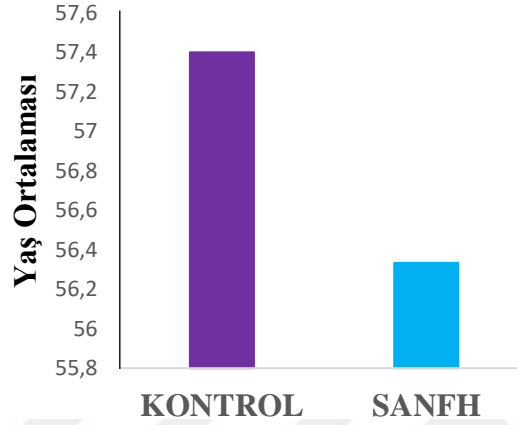
Tez çalışması sırasında yapılan biyoinformatik uygulamalar sonucunda RIPK1 geninin hsa-miR-6728 ve hsa-miR-6891 genleri ile ilişkili olduğu tespit edildi. miRTargetLink web programı ile elde edilen ve RIPK1 geni ile ilişkili olan miRNA'lar ve tez çalışmasında bulunan miRNA'lar arasında benzerlik bulunmadığı görüldü. Bu nedenle bulunan miRNA'lar RIPK1 geni için özgün değere sahiptir.



Şekil 4. 33 RIPK1 geni ile bağlantılı olan miRNA'lar

## 4.2 Periferik Kan Örnekleri

Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı tarafından toplanan periferik kan örneklerinin alındığı kontrol grubu bireylerinin yaş ortalamasının 57,4 ve SANFH tanısı koyulmuş bireylerin yaş ortalamasının 56,3 olduğu görülmüştür (Şekil 4.34).



Şekil 4. 34 Kan örneklerinin alındığı bireylerin yaş ortalamaları

## 4.3 miRNA İzolasyonu

İzole edilen miRNA'ların saflık oranları (A260/A280) ve konsantrasyonları (ng/μl) nanodrop cihazı ile ölçüldü ve Tablo 4.6'da belirtildi. Tüm miRNA'lar 45ng konsantrasyonda seyreltilerek kullanıldı.

Tablo 4. 6 miRNA izolasyonu sonuçları

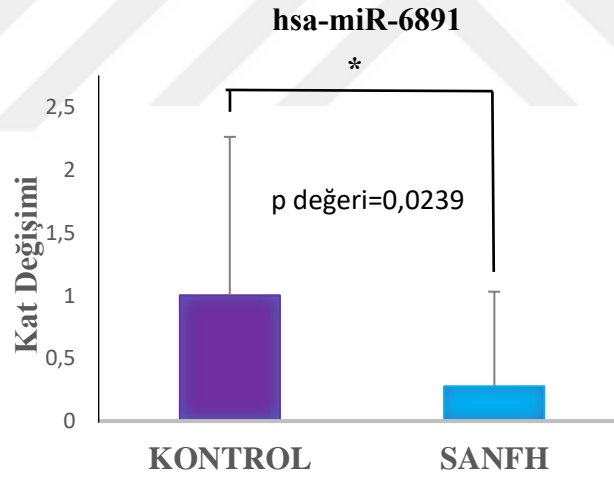
Kontrol	Konsantrasyon	260/280	SANFH	Konsantrasyon	260/280
S1	109,694	2,28	H1	140,996	2,04
S2	150,626	1,80	H2	112,414	1,85
S3	46,052	1,86	H3	121,508	1,85
S4	206,714	2,62	H4	103,178	2,65
S5	257,116	2,64	H5	51,778	2,31
S6	328,921	2,72	H6	53,055	1,95
S7	332,08	2,65	H7	97,342	2,07
S8	215,166	2,62	H8	140,175	2,28
S9	261,494	2,43	H9	125,834	2,11
S10	200,477	2,44	H10	119,054	2,19

S11	284,518	2,60	H11	184,941	2,13
S12	189,654	2,26	H12	94,047	2,09
S13	213,427	2,13	H13	131,699	1,87
S14	202,104	2,27	H14	95,207	2,21
S15	352,168	2,61	H15	62,252	2,20

\*A260/A280 değeri 1.8- 3.0 olanlar çalışmaya dahil edildi.

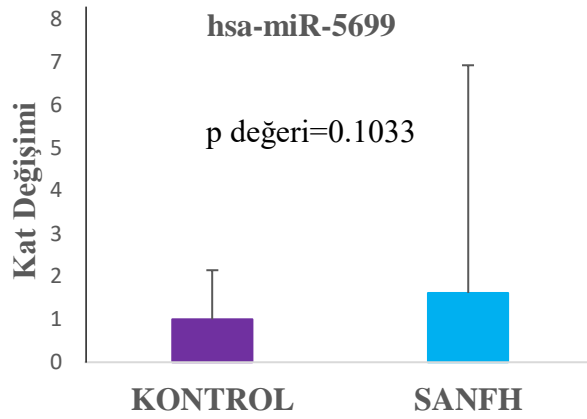
#### 4.4 RT-qPZR

SANFH hastalığı ile ilişkili RIPK1 ve MAPK genlerine ait RT-qPZR sonuçları Bölüm 3.5'te açıklanan yöntemler kullanılarak Excel programında hesaplandı. GraphPad Prism 9 programı ve RT-qPZR analizleri sonucu elde edilen genlere ait  $C_T$  değerleri kullanılarak Standart Sapma (Standart Deviation) ve p Değeri (p Value) hesaplandı. Bu veriler ve hesaplanan kat değişimleri Şekil 4.35 ve 4.36'teki grafiklerde gösterildi.



**Şekil 4. 35** SANFH hastalığının hsa-miR-6891 düzeylerine etkisi. Kontrol grubu ve SANFH grubu karşılaştırıldığında  $p < 0,05$ . Ortalama  $\pm$  standart sapma,  $n=15$ . Mann Whitney U testi.

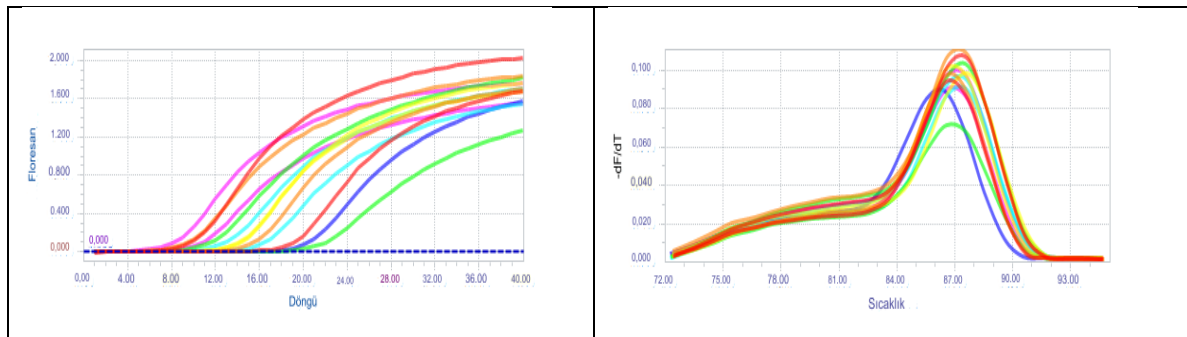
RIPK1 geni ile homoloji gösteren hsa-miR-6891'in gen ekspresyon sonucuna göre  $C_T$  değerlerinin kat değişimlerinin kontrole göre 0.8 kat azaldığı belirlendi. Ayrıca GraphPad Prim 9 programında p değeri 0.0239 olarak hesaplandı. Hasta ve kontrol  $C_T$  değerlerine göre yapılan istatistiksel verilerin anlamlı olduğu tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Sonuçlarımız SANFH'li bireylerin kanında hsa-miR-6891'in ekspresyonunun anlamlı bir şekilde azaldığını gösterdi.



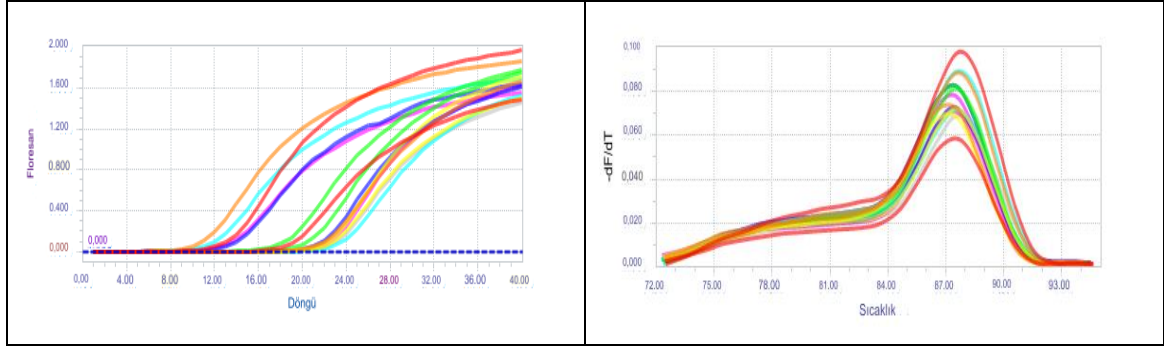
**Şekil 4. 36** SANFH hastalığının hsa-miR-5699 düzeylerine etkisi. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır, ortalama  $\pm$  standart sapma, n:15. Mann Whitney U testi.

MAPK geni ile homoloji gösteren hsa-miR-5699'un gen ekspresyon sonucu değerlendirildiğinde;  $C_T$  değerlerinin kat değişiminin kontrol grubuna kıyasla 1.6 kat arttığı belirlendi. Ayrıca GraphPad Prism 9 programında p değeri 0.1033 olarak hesaplandı. Hasta ve kontrol  $C_T$  değerlerine göre yapılan istatistiksel verilerin anlamlı olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ). Sonuçlarımız hsa-miR-5699 seviyesinin SANFH'li bireylerde yüksek ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterdi.

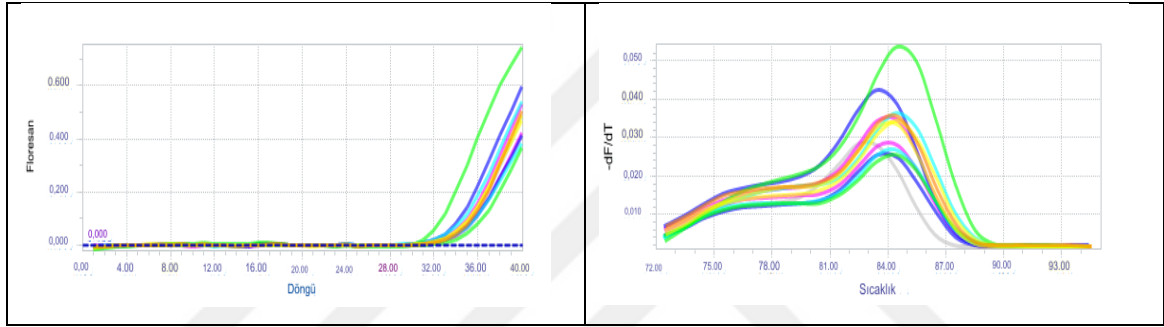
RT-qPZR sonucunda oluşturulan ve RIPK1, MAPK ve 5S genlerine ait Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri Şekil 4.37, 4.38, 4.39, 4.40, 4.41, 4.42'de gösterildi.



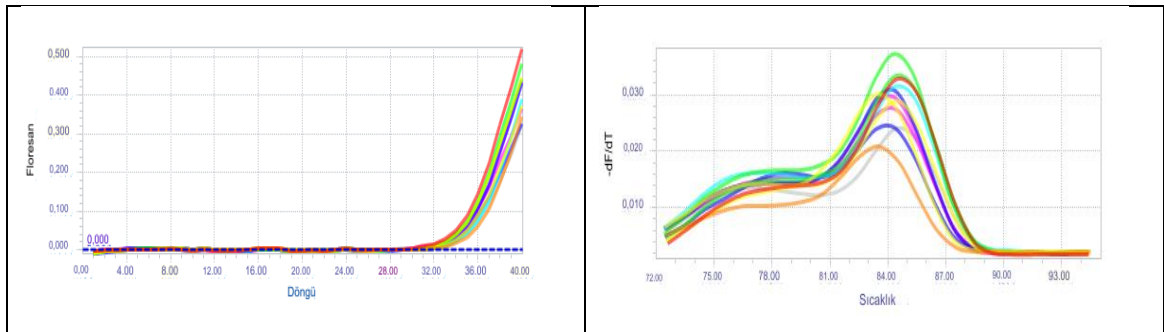
**Şekil 4. 37** 5S geni SANFH hastası Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri



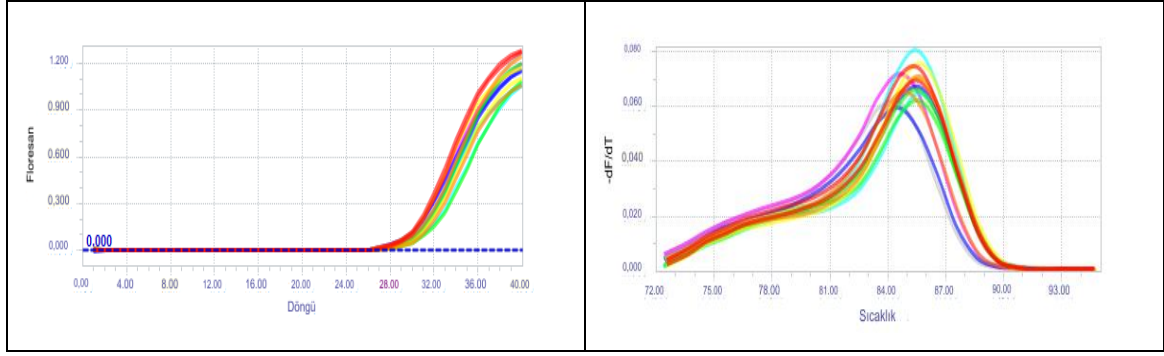
Şekil 4. 38 5S geni kontrol grubu Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri



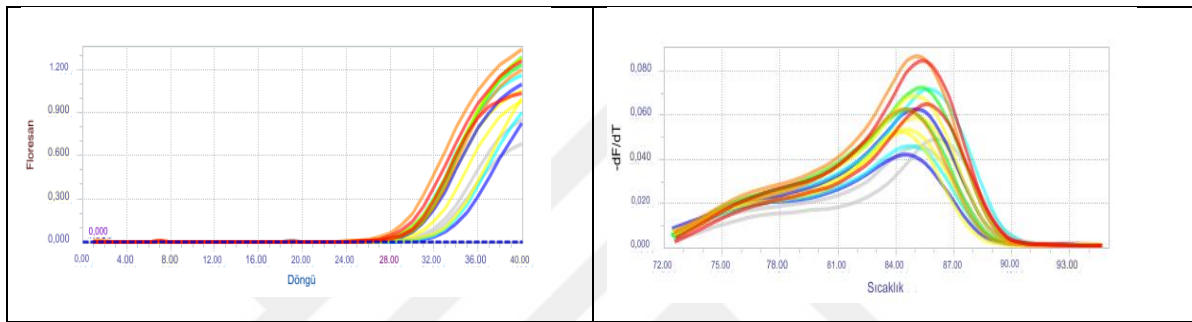
Şekil 4. 39 MAPK geni SANFH hastası Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri



Şekil 4. 40 MAPK geni kontrol grubu Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri



Şekil 4. 41 RIPK1 geni SANFH hastası Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri



Şekil 4. 42 RIPK1 geni kontrol grubu Amplifikasyon Eğrisi ve Erime Eğrisi grafikleri

## 5. TARTIŞMA

Steroid kaynaklı femur başı avasküler nekrozunda miRNA'ların; ekspresyon seviyelerinin değiştiği, osteoblast farklılaşmasında rol oynadıkları ve kemik homeostazisinde düzenleyici etkisinin olduğunun bilinmesi biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir [12, 46, 47].

Bu amaçla gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında; *in siliko* yöntemler kullanılarak SANFH ile ilgili RIPK1 ve MAPK genlerine ait miRNA dizileri belirlendi ve bu diziler arasındaki ilişki incelenerek RIPK1 geni için miR-6891 ve MAPK geni için miR-5699 seçildi, bu genler ile miRNA'lar arasında gen hizalaması, filogenetik ağaçlar ve ikincil yapılar oluşturulduktan sonra KEGG-GO analizleri yapıldı.

Amasya Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Polikliniğinden temin edilen kan örneklerinden miRNA izolasyonu yapılarak RT-qPCR yöntemi ile ekspresyon seviyeleri belirlendi. Kontrol ve hastalar arasındaki MAPK ve RIPK1 genlerine ait miRNA'ların C<sub>T</sub> değerleri kullanılarak istatistiksel çalışmalar yapıldı.

SANFH hastalığı, MAPK ve RIPK1 genler ile miRNA'lara ait literatür araştırmaları sonucunda elde edilen veriler aşağıda detaylı olarak sunulmuştur.

Shi ve arkadaşları 2022 yılında yaptıkları çalışmada Gene Expression Omnibus veri tabanından elde edilen oksidatif stresle ilgili genler araştırıldı. GO ve sinyal yolları analizi DAVID, Metascape ve GSEA kullanılarak yapıldı. Protein-protein etkileşimi (PPI) ağı, STRING veri tabanı kullanılarak oluşturuldu ve hub genlerini taramak için Cytoscape yazılımının algoritması kullanıldı. Son olarak, hub genlerinin transkripsiyonel faktörlerini (TF'ler) bulmak için NetworkAnalyst web aracı kullanıldı. Veritabanında 440 oksidatif stresle ilişkili gen bulundu ve bu genlerden esas olarak MAPK, PI3K-AKT-mTOR ve FOXO gibi çeşitli sinyal yollarının yer aldığı görüldü. İlk 10 hub geni JUN, FOXO3, CASP3, JAK2, RELA, EZH2, ABL1, PTGS2, FBXW7 ve MCL1'dir. Ayrıca TFAP2A, GATA2, SP1 ve E2F1 hub genlerin anahtar düzenleyici faktörleri olabileceği de bildirildi [119].

Lin ve arkadaşları 2021 yılında 30 SANFH hastasına ait, 10 SANFH tanısı olmayan hastanın kan serumu ayrıca 4 SANFH hastası ile 4 sağlıklı kontrolden alınan kalça kırık örnekleri kullanıldı ve mikrodizi veri setleri Gene Expression Omnibus veri tabanından elde edildi. KEGG ve GO yolu zenginleştirme analizi gerçekleştirilerek GEO2R aracılığıyla bir protein-protein etkileşimi (PPI) ağı oluşturuldu ve PPI ağını birden fazla alt ağa bölmek için

sitoHubba'yı kullanıldı. PPI ağında CXCR1, FPR1, TYROBP, MAPK1, FOXO3, FPR2 ve CXCR2 gibi yüksek etkileşimli hub genleri tanımlandı. Genler ile ilgili biyoinformatik çalışmaları ve RT-qPZR analizleri yapıldı. Periferik serum örneklerinden toplam RNA, Trizol LS ile izole edildi ve istatistiksel analiz gerçekleştirmek için ise GraphPad 8.0 kullanıldı. SANFH hastalarının periferik kanında CXCR1, FPR1 ve TYROBP genlerinin yukarı regüle edildiği ve MAPK1 geninin ise aşağı regüle edildiği ortaya çıkarıldı ( $P < 0.05$ ). İki grup arasında periferik serum örneklerinde FOXO3, FPR2 ve CXCR2 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunamadı ( $P > 0.05$ ). Çalışma sonucu olarak SANFH'de yer alan genler ve ilgili yollar hakkında yeni bilgiler sağlanmış olup CXCR1, FPR1, TYROBP ve MAPK1 genlerinin SANFH'nin tanısı ve prognozu için potansiyel ilaç hedefleri ve biyobelirteçler olarak hizmet edebileceği belirtildi [120].

Fan ve arkadaşları 2022 çalışmalarında ONFH hastalarının kemik dokularından Hematoksilen, immünohistokimya ve BMEC izolasyonu için klinik örnekler topladı. Hücre canlılığını Hücre Sayım Kiti-8 ile değerlendirdi. Ayrıca nekroptoz seviyesi TUNEL ve Annexin V-FITC/PI boyamasıyla tespit edildi. Ek olarak TNF- $\alpha$ 'nın mRNA ekspresyon seviyesi RT-qPZR ve RIP1/RIP3/MLKL protein seviyesi Western blotlama yöntemleri ile araştırıldı. Çalışma da ONFH hastalarının kemik dokularında TNF- $\alpha$ 'nın önemli ölçüde yukarı regülasyonu tespit edildi. Ayrıca Western blot sonuçlarına göre RIP1/RIP3/MLKL'nin nekroptoz aktivasyonu gösterildi. Araştırmada ONFH gelişiminde nekroptozun RIP1/RIP3/MLKL sinyal yoluyla aktive edildiği bildirildi [121].

Miao ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada total kalça artroplastisi yapılan toplam 44 femur başı AVN hastasından doku örnekleri toplandı. OPG, RANK ve RANKL genlerinin ekspresyonu floresan qPZR tekniğini ile, OPG, RANKL protein seviyeleri Western blot analizi ile belirlendi. Çalışma verilerine ait istatistiksel analizler SPSS 16.0 yazılımında Wilcoxon rank-sum testi kullanılarak yapıldı. Femur başı AVN dokularında OPG'nin mRNA seviyelerinde artış belirlendi ancak istatistiksel olarak anlamlılık görülmedi ( $P > 0.05$ ). RANK ve RANKL'nin ekspresyonu nekrotik dokularda önemli ölçüde arttı ( $P < 0.05$ ). Western blot analizi sonucunda OPG ve RANKL protein seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı. OPG ve RANKL'nin floresan qPZR tekniği ile gen ekspresyonunun kemik yıkımı üzerindeki potansiyeli dikkate değer bulundu [122].

Tez çalışmamda NCBI veri tabanından SANFH hastalığı ile ilişkili MAPK ve RIPK1 gen dizileri Fasta formatında elde edildi. miRBase veri tabanından ise insanla ilişkili tüm miRNA dizileri alındı. Yapılan biyoinformatik çalışmalar sonucunda SANFH ile ilgili olan

OPG, RANK, RANKL, EGFR, RIPK1, MAPK, AKT genleri üzerine araştırmalar yapıldı ancak içinden RIPK1 ve MAPK genleri seçilerek araştırmalara devam edildi. SANFH ile ilişkili genler arasında seçim yapılırken RIPK1 geninin apoptoz ve nekroptoz üzerinde etkili olması ve MAPK geninin MSC'lerin osteogenezinde önemli rol oynaması dikkate alındı. MAPK ve RIPK1 genleri ile miRNA'lar arasında Blast yapılarak E değeri  $\leq 1$  ve eşleşme değeri  $\geq 12$  olan miRNA dizileri seçildi. Seçilen miRNA dizileri ile genler arasında en fazla 7 yanlış eşleşme olanları "Base Maching" yazılımı kullanılarak listelendi. Seçilen miRNA'lara ait filogenetik ağaçlar (MEGA), ikincil yapılar (RNAFold) oluşturuldu ve KEGG-GO analizleri (GeneMANIA, miRTargetLink) yapıldı. SANFH hastalığı ile ilişkili MAPK geni ile homoloji gösteren yirmi bir, RIPK1 geni ile homoloji gösteren iki miRNA tespit edildi.

Çalışmanın devamında Amasya Sabuncuoğlu şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji servisinden temin edilen 15 SANFH hastası ve 15 SANFH tanısı koyulmamış bireylerden alınan kan örnekleri toplandı. MAPK ve RIPK1 genlerine ait miRNA seviyeleri RT-qPZR yöntemi kullanılarak ölçüldü. GraphPad Prism 9 programı ile kontrol ve hastalar arasındaki MAPK ve RIPK1 genleri ile homoloji gösteren hsa-miR-5699 ve hsa-miR-6891'e ait  $C_T$  değerlerine ait istatistiksel çalışma sonucunda elde edilen verilere göre SANFH tanısı koyulan bireylerde SANFH tanısı koyulmamış bireylere oranla RIPK1 geni ile homoloji gösteren hsa-miR-6891'in ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın ( $p < 0.05$ ) olduğu, MAPK geni ile homoloji gösteren hsa-miR-5699'un ifadesinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artmanın ( $p > 0.05$ ) olduğu görüldü.

Yuan ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı çalışmada, total kalça artroplastisi yapılan ONFH'li 9 hasta ve kontrol grubu olarak da femur boyun kırığı olan 6 hasta seçilerek değerlendirme yapıldı. Trizol reaktifini kullanılarak kemik dokusundaki miRNA'lar izole edildikten sonra RNA örneklerinin bütünlüğü ve konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Önemli miktarlarda ifade edilen miRNA'lar için biyoinformatik analiz yapıldı. RT-qPZR analizlerinde U6 housekeeping gen olarak kullanılırken, öngörülen yollarda yer alan HIF-1  $\alpha$ , VEGF-A, Hes1,  $\beta$ -katenin genleri test edildi. Biyoinformatik alışmalar sonucunda tanımlanan 2578 miRNA arasında 17'si tutarlı bir şekilde diferansiyel olarak eksprese edildi ve RT-qPZR analizlerinde on iki miRNA'nın (miR-181c-3p, miR-34a-3p, miR-146a-5p, miR-187-3p, miR-181a-3p, miR-30c-1-3p, miR-650, miR-3652, miR-4444, miR-1273e, miR-99a-3p, miR-3064-5p) dikkat çekici ölçüde yukarı regüle edildiği ( $p < 0.05$ ), beş miRNA'nın (miR-212-3p, miR-212-5p, miR-132-3p,

miR-629-3p, miR-6836-5p) belirgin şekilde aşağı regüle edildiği ( $p < 0,05$ ) bulundu. Çalışma sonucunda ONFH'nin onarıcı arayüzünde miRNA'nın düzensizliği ortaya çıkarıldı [123].

Wei ve arkadaşları 2018 yılında yaptığı çalışmada ONFH-N'li (Travmatik ve travmatik olmayan ONFH) 43 hasta ve ONFH-N'siz 43 katılımcıdan kan örnekleri toplayarak toplam RNA izolasyonu, mikrodizi analizi, RT-qPZR analizi, biyoinformatik ve istatistiksel analiz yapıldı. miRNA izolasyonunu için TRIzol kullanıldı, RNA saflığı NanoDrop spektrofotometre kullanarak ölçüldü ve RNA bütünlüğü ise jel elektroforezi ile değerlendirildi. Rastgele seçilen üç hasta ve üç kontrolden alınan örnekler ile mikrodiziler kullanarak miRNA ekspresyon profili oluşturuldu. Tanımlanan miRNA'ların TaqMan MicroRNA Test Kiti kullanarak RT-qPZR analizleri yapıldı. miRNA'ların hedef genlerini bulmak için TargetScan ve miRanda veri tabanları arandı, KEGG ve GO analizleri ile miRNA'ların zenginleştirilmiş yolları tanımlandı. Tüm istatistiksel analizler için SPSS 18.0 programı kullanıldı. ONFH hastalarında kontrollerle karşılaştırıldığında Serum leptin ve ApoB seviyelerinin daha yüksek, serum adiponektin ve ApoA1 seviyelerinin daha düşük ( $P < 0.001$ ) olduğu görüldü. Diferansiyel olarak elde edilen 102 miRNA'dan 31'i ONFH-N ve kontroller arasında önemli ölçüde farklı şekilde ifade edildiği görüldü. RT-qPZR analizlerine göre ONFH-N'li hastalarda; dokuz miRNA'nın (miR-335-5p, miR-413-5p, miR-379-5p, miR-134-5p, miR-370-3p, miR-31-5p, miR-29b-3p) aşağı regüle edildiği, beş miRNA'nın (miR-100-5p, miR-34a-5p, miR-30b-3p, miR-675-5p ve miR-125b-5p) ise yukarı regüle edildiği görüldü. Sonuç olarak ONFH-N'de farklı şekilde eksprese edilen miRNA'ların bulunduğu ve bu miRNA'ların ONFH patogenezindeki rolünün tam olarak belirlenmesi için ek araştırmalara ihtiyaç olduğu vurgulandı [124].

Zang ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmada SONFH'si olmayan 5 Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) hastası, SONFH'si olan 5 SLE hastası (SLE-SONFH) ve 5 sağlıklı kişinin kan serumundan elde edilen eksozom karakterleri belirlendi. Eksprese edilen miRNA'ların profilini çıkarmak için kapsamlı eksozomal miRNA dizilimi yapıldı, seçilen miRNA'ların ekspresyon seviyelerini RT-qPZR ile doğrulandı. Veriler hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-514a-3p ve hsa-miR-708-5p'nin farklı şekillerde ifade edildiği gösterildi. RT-qPZR sonuçları, hsa-miR-135b-5p ifadesinin SLE-SONFH grubunda yukarı regüle edildiği doğrulandı. *In silico* çalışmalarda Wnt, MAPK ve Hippo sinyal yollarının farklı şekilde eksprese edilen miRNA'ların zenginleştirilmiş fonksiyon ve yollarının olduğu gösterildi. Çalışmanın sonucunda hsa-miR-135b-5p'nin SONFH için tanısal biyobelirteç olarak kullanılabileceği vurgulandı [125].

Zang ve arkadaşları tarafından 2018 yılı çalışmalarında insan nöral kök hücre miRNA'larına ait ekspresyon profilleri belirlendi. İnsan beyin dokusundan eksozomal miRNA izolasyonu, sekans analizi ve Western blot analizi yapıldı. Çalışmada nöral kök hücre hastalığı ile ilişkili miRNA'lar arasında hsa-miR-5699-5p verildi. hsa-miR-214-3p ifadesinin RT-qPZR analizi ile seviyesinin anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu. Ayrıca yaptıkları çalışmada nöral kök hücre ile ilişkili PI3K/Akt, Hippo, MAPK, mTOR, FoxO, Rap1 ve cGMP-PKG sinyali yolaklarının KEGG ve GO analizleri verildi [126].

Tez çalışmamda, Amasya Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Polikliniği tarafından, miRNA seviyelerini belirlemek üzere toplanan birer tüp periferik kan örneklerinden kontrol (SANFH tanısı olmayan) grubu ve deney (SANFH tanısı olan) grupları hazırlandı. Biyoinformatik çalışmalar sonucunda SANFH ile ilişkili yollarda yer alan MAPK ve RIPK1 genleri ve bu genlerle ilişkili hsa-miR-5699 ve hsa-miR-6891 miRNA'larının RT-qPZR analizlerinde kullanımına karar verildi. miRNA'lar tam kandan "NucleoGene" firmasına ait kit kullanılarak izole edildikten sonra konsantrasyonlarının ölçümü NanoDrop cihazı ile A260/A280nm dalga boyunda yapıldı. RT-qPZR analizleri ile elde edilen  $C_T$  değerleri kullanılarak yapılan istatistiksel çalışmalarda MAPK geni ile homoloji gösteren hsa-miR-5699'un ifadesinde  $C_T$  değerlerinin kat değişiminde kontrole göre 1.6 kat artma, RIPK1 geni ile homoloji gösteren hsa-miR-6891'in ifadesinde  $C_T$  değerlerinin kat değişiminde kontrole göre 0.8 kat azalma olduğu tespit edildi. Ayrıca miRTargetLink web yazılımı kullanılarak yapılan KEGG ve GO analizlerinde MAPK geninin hsa-miR-214 ile ilişkisi belirlendi.

ELhafeez ve arkadaşları 2023 yılında yaptıkları çalışmada meme kanseri olan 96 kadın hasta, benign meme hastalıkları olan 30 hasta ve 25 kontrol gruplarını içeren 151 bireyden topladıkları kan örneklerini kullanarak hsa-miR-1202 ve hsa-miR-146a-5p'nin ifadeleri RT-qPZR kullanarak ölçüldü ve tanısal rolleri istatistiksel olarak test edildi. hsa-miR-1202'nin meme kanseri ve benign meme hastalıkları olan bireylerde yukarı doğru, hsa-miR-146a-5p'nin meme kanseri olan bireylerde aşağı doğru düzenlendiği bulundu. [127].

Takashima ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmada Primer Santral Sinir Sistemi Lenfoması bulunan 40 hastanın tümör örneğinden miRNA izole edilmiştir. hsa-miR-101, hsa-miR-548b, hsa-miR-554 ve hsa-miR-1202 dört miRNA'nın, kanser bağışıklığı ile ilgili genleri etkili bir şekilde kontrol ettiği görülmüştür [128].

Zhu ve arkadaşları 2016 yılında metastatik renal hücreli karsinom hastalığı ile ilişkili miRNA-mRNA düzenleyici ağı kurarak yaptığı çalışmada RT-qPZR ve çift lusiferaz raportör

gen tahlili ile mRNA'ların miRNA'lar tarafından düzenlendiği gösterildi. Metastatik renal hücreli karsinomu olan hastalarda 31 miRNA'nın yukarı regüle edildiği, 196 miRNA'nın aşağı regüle edildiği belirlendi. Aşağı regüle edilen miRNA'lardan birisinin de hsa-miR-1203 olduğu ve ekspresyon profilinin miRNA gen çipi analizinden elde edilen sonuçlarla tutarlı olduğu belirtildi [129].

Yu ve arkadaşları 2021 yılında yaptığı çalışmada diyabetik nefropatiye sahip üç hastadan ve üç sağlıklı kontrolden periferik kan örnekleri topladı. RNA izolasyonu ve PZR ve istatistiksel analiz yaparak elde ettikleri sonuçlarda kontrollere karşı diyabette diferansiyel olan hastalarda hsa-miR-1237-3p'nin yukarı regüle olduğu belirtildi [130].

Lee ve arkadaşlarının 2023 yılında miRNA izolasyonu ve qPZR kullanarak hepatoma ve pankreas kanseri üzerine yaptığı çalışmada hsa-miR-1976'nın hücre içi seviyelerinin kemosenitiviteyi belirlediği bulunmuştur [131].

SANFH hastalığında miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılması ile ilgili yapmış olduğum tez çalışmamda biyoinformatik uygulamalar ile MAPK geninin hsa-miR-1202, hsa-miR-1203, hsa-miR-1237 ve hsa-miR-1976 ile ilişkili olduğu belirlendi.

## 6. SONUÇ

Son yıllarda steroid bazlı antiinflamatuvarlar, antialerjik ajanlar kanser, obezite, diyabet, romatoid artrit gibi ciddi hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır. Yüksek dozlarda ve uzun süreli steroid tedavisi SANFH riskini artırmaktadır. SANFH'nda miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin değiştiği ve osteoblast farklılaşmasında rol oynadıkları gösterilmiştir. miRNA'lar osteogenez, osteoklastogenez ve adipogenezin düzenlenmesinde rol alması nedeniyle iskelet hastalıklarının tedavisi için yeni bir hedef olarak gösterilmektedir, çok sayıda miRNA'nın gen modilatörleri olarak rol aldıkları doğrulanmıştır ve miRNA seviyelerindeki değişiklikler tanısal biyobelirteç olarak kullanılabilir.

Bu çalışmada steroid kaynaklı femur başı avasküler nekrozu hasta kanlarında potansiyel miRNA'ların belirlenmesi ve biyobelirteç olarak kullanımı amaçlanmıştır.

- miRBASE veri tabanından 2630 olgun miRNA dizisi elde edildi,
- NCBI sitesindeki BLASTn programı kullanılarak RIPK1 geni için yirmi altı ve MAPK geni için elli dokuz miRNA bulundu,
- RNAhybrid programları kullanılarak RIPK1 geni için üç ve MAPK geni için yirmi altı miRNA seçildi,
- RNAfold programı kullanılarak RIPK1 geni ile homoloji gösteren iki adet ve MAPK geni ile homoloji gösteren yirmi bir adet miRNA tespit edildi,
- MEGA programları kullanılarak elde edilen miRNA'lar arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik ağaçlar çizildi,
- GeneMANIA programı ile RIPK1 ve MAPK genleri için nekroptotik süreçler ve nekrotik hücre ölümü fonksiyonları yedi farklı kategoride incelendi,
- Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji polikliniği tarafından periferik kan örnekleri toplandı,
- Tam kan örneklerinden RIPK1 ve MAPK genleri ile homoloji gösteren miRNA'lar izole edilerek ve RT-qPZR yöntemi kullanılarak ekspresyon seviyeleri belirlendi.

Sonuç olarak; steroid kaynaklı femur başı avasküler nekrozu ile ilişkili MAPK geni ile homoloji gösteren yirmi bir ve RIPK1 geni ile homoloji gösteren iki miRNA tanımlandı. Hedef genlerin KEGG ve GO analizlerinde bu miRNA'ların önemli roller oynayabileceği ve pek çok biyolojik olayı düzenleyebileceği ortaya koyuldu. RT-qPZR sonuçları SANFH

hastalarının periferik kanında RIPK1 geni ile ilişkili olan hsa-miR-6891'in aşağı regüle edildiğini, MAPK geni ile ilişkili olan hsa-miR-5699'un yukarı regüle edildiğini gösterdi. Elde edilen bilgiler doğrultusunda, hsa-miR-6891 ve hsa-miR5699'un steroid kaynaklı femur başı avasküler nekrozu hastalığı ile ilişkilendirilebileceği, özellikle nekroptozla ilişkili olan RIPK1 geni ile homoloji gösteren hsa-miR-6891'in SANFH hastalığının tanı ve teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

1. George, G., & Lane, J. M. (2022). Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Am Acad Orthop Surg Glob Res Rev*, 6(5). doi:10.5435/JAAOSGlobal-D-21-00176
2. Chang, C., Greenspan, A., & Gershwin, M. E. (2020). The pathogenesis, diagnosis and clinical manifestations of steroid-induced osteonecrosis. *J Autoimmun*, 110, 102460. doi:10.1016/j.jaut.2020.102460
3. Lespasio, M. J., Sodhi, N., & Mont, M. A. (2019). Osteonecrosis of the Hip: A Primer. *Perm J*, 23. doi:10.7812/TPP/18-100
4. Weinstein, R. S. (2012). Glucocorticoid-induced osteonecrosis. *Endocrine*, 41(2), 183-190. doi:10.1007/s12020-011-9580-0
5. Hines, J. T., Jo, W. L., Cui, Q., Mont, M. A., Koo, K. H., Cheng, E. Y., . . . Park, J. W. (2021). Osteonecrosis of the Femoral Head: an Updated Review of ARCO on Pathogenesis, Staging and Treatment. *J Korean Med Sci*, 36(24), e177. doi:10.3346/jkms.2021.36.e177
6. Pijnenburg, L., Felten, R., & Javier, R. M. (2020). [A review of avascular necrosis, of the hip and beyond]. *Rev Med Interne*, 41(1), 27-36. doi:10.1016/j.revmed.2019.10.332
7. Konarski, W., Pobozy, T., Sliwczynski, A., Kotela, I., Krakowiak, J., Hordowicz, M., & Kotela, A. (2022). Avascular Necrosis of Femoral Head-Overview and Current State of the Art. *Int J Environ Res Public Health*, 19(12). doi:10.3390/ijerph19127348
8. Chen, K., Liu, Y., He, J., Pavlos, N., Wang, C., Kenny, J., . . . He, W. (2020). Steroid-induced osteonecrosis of the femoral head reveals enhanced reactive oxygen species and hyperactive osteoclasts. *Int J Biol Sci*, 16(11), 1888-1900. doi:10.7150/ijbs.40917
9. Mont, M. A., Salem, H. S., Piuizzi, N. S., Goodman, S. B., & Jones, L. C. (2020). Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head: Where Do We Stand Today?: A 5-Year Update. *J Bone Joint Surg Am*, 102(12), 1084-1099. doi:10.2106/JBJS.19.01271
10. Zhu, H. Y., Gao, Y. C., Wang, Y., & Zhang, C. Q. (2016). Circulating exosome levels in the diagnosis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. *Bone Joint Res*, 5(6), 276-279. doi:10.1302/2046-3758.56.BJR-2015-0014.R1
11. Al-Omari, A. A., Aleshawi, A. J., Marei, O. A., Younes, H. M. B., Alawneh, K. Z., E, A. L., & Mohaidat, Z. M. (2020). Avascular necrosis of the femoral head after single steroid intra-articular injection. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 30(2), 193-197. doi:10.1007/s00590-019-02555-8
12. Wang, G., Zhang, L., Yan, C., & Zhang, Y. (2022). Upregulation of microRNA-576-5p protects from steroid-induced avascular necrosis of the femoral head by suppressing ANXA2. *Cell Cycle*, 21(1), 49-62. doi:10.1080/15384101.2021.1988377

13. Zhang, S. Y., Wang, F., Zeng, X. J., Huang, Z., & Dong, K. F. (2021). Astragalus polysaccharide ameliorates steroid-induced osteonecrosis of femoral head through miR-206/HIF-1alpha/BNIP3 axis. *Kaohsiung J Med Sci*, 37(12), 1089-1100. doi:10.1002/kjm2.12426
14. Assouline-Dayana, Y., Chang, C., Greenspan, A., Shoenfeld, Y., & Gershwin, M. E. (2002). Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. *Semin Arthritis Rheum*, 32(2), 94-124. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12430099>
15. Powell, C., Chang, C., Naguwa, S. M., Cheema, G., & Gershwin, M. E. (2010). Steroid induced osteonecrosis: An analysis of steroid dosing risk. *Autoimmun Rev*, 9(11), 721-743. doi:10.1016/j.autrev.2010.06.007
16. Weinstein, R. S., & Manolagas, S. C. (2005). Apoptosis in glucocorticoid-induced bone disease. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 12(3), 219-223.
17. Xue, X. H., Feng, Z. H., Li, Z. X., & Pan, X. Y. (2018). Salidroside inhibits steroid-induced avascular necrosis of the femoral head via the PI3K/Akt signaling pathway: In vitro and in vivo studies. *Mol Med Rep*, 17(3), 3751-3757. doi:10.3892/mmr.2017.8349
18. Liu, Y., Zong, Y., Shan, H., Lin, Y., Xia, W., Wang, N., . . . Jiang, C. (2020). MicroRNA-23b-3p participates in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by suppressing ZNF667 expression. *Steroids*, 163, 108709. doi:10.1016/j.steroids.2020.108709
19. Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., & Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci*, 20(24). doi:10.3390/ijms20246249
20. Lu, T. X., & Rothenberg, M. E. (2018). MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol*, 141(4), 1202-1207. doi:10.1016/j.jaci.2017.08.034
21. Wei, J. H., Luo, Q. Q., Tang, Y. J., Chen, J. X., Huang, C. L., Lu, D. G., & Tang, Q. L. (2018). Upregulation of microRNA-320 decreases the risk of developing steroid-induced avascular necrosis of femoral head by inhibiting CYP1A2 both in vivo and in vitro. *Gene*, 660, 136-144. doi:10.1016/j.gene.2018.03.045
22. Wu, X., Sun, W., & Tan, M. (2019). Noncoding RNAs in Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head. *Biomed Res Int*, 2019, 8140595. doi:10.1155/2019/8140595
23. Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*, 15(6), 321-333. doi:10.1038/nrc3932

24. Chen, L., Heikkinen, L., Wang, C., Yang, Y., Sun, H., & Wong, G. (2019). Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Brief Bioinform*, 20(5), 1836-1852. doi:10.1093/bib/bby054
25. Ho, P. T. B., Clark, I. M., & Le, L. T. T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *Int J Mol Sci*, 23(13). doi:10.3390/ijms23137167
26. Liu, G., Luo, G., Bo, Z., Liang, X., Huang, J., & Li, D. (2016). Impaired osteogenic differentiation associated with connexin43/microRNA-206 in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. *Exp Mol Pathol*, 101(1), 89-99. doi:10.1016/j.yexmp.2016.07.009
27. Peng, W. X., Ye, C., Dong, W. T., Yang, L. L., Wang, C. Q., Wei, Z. A., . . . Zhang, J. (2017). MicroRNA-34a alleviates steroid-induced avascular necrosis of femoral head by targeting Tgif2 through OPG/RANK/RANKL signaling pathway. *Exp Biol Med (Maywood)*, 242(12), 1234-1243. doi:10.1177/1535370217703975
28. Yang, F., Zhang, X., Song, T., Li, X., Lv, H., Li, T., . . . Xu, X. (2022). Huogu injection alleviates SONFH by regulating adipogenic differentiation of BMSCs via targeting the miR-34c-5p/MDM4 pathway. *Gene*, 838, 146705. doi:10.1016/j.gene.2022.146705
29. Zhao, D., Zhang, F., Wang, B., Liu, B., Li, L., Kim, S. Y., . . . Qin, L. (2020). Guidelines for clinical diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults (2019 version). *J Orthop Translat*, 21, 100-110. doi:10.1016/j.jot.2019.12.004
30. Seamon, J., Keller, T., Saleh, J., & Cui, Q. (2012). The pathogenesis of nontraumatic osteonecrosis. *Arthritis*, 2012, 601763. doi:10.1155/2012/601763
31. Guggenbuhl, P., Robin, F., Cadiou, S., & Albert, J. D. (2021). Etiology of avascular osteonecrosis of the femoral head. *Morphologie*, 105(349), 80-84. doi:10.1016/j.morpho.2020.12.002
32. Li, H., Meng, D., Zhang, X., & Yuan, D. (2019). Effect of psoralen on the expression of PPARgamma, osteocalcin, and trabecular bone area in rabbits with steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. *J Orthop Surg Res*, 14(1), 11. doi:10.1186/s13018-018-1054-0
33. Chang, C., Greenspan, A., Beltran, J., & Gershwin, M. E. (2017). Osteonecrosis. *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*, 1764.
34. Guerado, E., & Caso, E. (2016). The physiopathology of avascular necrosis of the femoral head: an update. *Injury*, 47 Suppl 6, S16-S26. doi:10.1016/S0020-1383(16)30835-X
35. Sun, F., Zhou, J. L., Liu, Z. L., Jiang, Z. W., & Peng, H. (2022). Dexamethasone induces ferroptosis via P53/SLC7A11/GPX4 pathway in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head. *Biochem Biophys Res Commun*, 602, 149-155. doi:10.1016/j.bbrc.2022.02.112

36. Powell, C., Chang, C., & Gershwin, M. E. (2011). Current concepts on the pathogenesis and natural history of steroid-induced osteonecrosis. *Clin Rev Allergy Immunol*, *41*(1), 102-113. doi:10.1007/s12016-010-8217-z
37. Kang, J. H., & Lin, H. C. (2010). Increased risk for coronary heart disease after avascular necrosis of femoral head: A 3-year follow-up study. *Am Heart J*, *159*(5), 803-808 e801. doi:10.1016/j.ahj.2010.02.020
38. Rister, A. L., & Dodds, E. D. (2020). Steroid analysis by ion mobility spectrometry. *Steroids*, *153*, 108531. doi:10.1016/j.steroids.2019.108531
39. Cole, T. J., Short, K. L., & Hooper, S. B. (2019). The science of steroids. *Semin Fetal Neonatal Med*, *24*(3), 170-175. doi:10.1016/j.siny.2019.05.005
40. Yuan, T. F., Le, J., Wang, S. T., & Li, Y. (2020). An LC/MS/MS method for analyzing the steroid metabolome with high accuracy and from small serum samples. *J Lipid Res*, *61*(4), 580-586. doi:10.1194/jlr.D119000591
41. Schiffer, L., Barnard, L., Baranowski, E. S., Gilligan, L. C., Taylor, A. E., Arlt, W., . . . Storbeck, K. H. (2019). Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *194*, 105439. doi:10.1016/j.jsbmb.2019.105439
42. Olesti, E., Boccard, J., Visconti, G., Gonzalez-Ruiz, V., & Rudaz, S. (2021). From a single steroid to the steroidome: Trends and analytical challenges. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *206*, 105797. doi:10.1016/j.jsbmb.2020.105797
43. Donova, M. V. (2017). Steroid Bioconversions. *Methods Mol Biol*, *1645*, 1-13. doi:10.1007/978-1-4939-7183-1\_1
44. Huang, C., Wen, Z., Niu, J., Lin, S., & Wang, W. (2021). Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head: Novel Insight Into the Roles of Bone Endothelial Cells in Pathogenesis and Treatment. *Front Cell Dev Biol*, *9*, 777697. doi:10.3389/fcell.2021.777697
45. Wang, A., Ren, M., & Wang, J. (2018). The pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: A systematic review of the literature. *Gene*, *671*, 103-109. doi:10.1016/j.gene.2018.05.091
46. Zhang, Y., Ma, L., Lu, E., & Huang, W. (2021). Atorvastatin Upregulates microRNA-186 and Inhibits the TLR4-Mediated MAPKs/NF-kappaB Pathway to Relieve Steroid-Induced Avascular Necrosis of the Femoral Head. *Front Pharmacol*, *12*, 583975. doi:10.3389/fphar.2021.583975
47. Zhu, W., Zhang, F., Lu, J., Ma, C., Shen, L., Hu, D., . . . Shuai, B. (2022). The analysis of Modified Qing' E Formula on the differential expression of exosomal miRNAs in the femoral head bone tissue of mice with steroid-induced ischemic necrosis of femoral head. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *13*, 954778. doi:10.3389/fendo.2022.954778

48. Melo, S. A., & Kalluri, R. (2012). Molecular pathways: microRNAs as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*, *18*(16), 4234-4239. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2010
49. Diener, C., Keller, A., & Meese, E. (2022). Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. *Trends Genet*, *38*(6), 613-626. doi:10.1016/j.tig.2022.02.006
50. Ferragut Cardoso, A. P., Banerjee, M., Nail, A. N., Lykoudi, A., & States, J. C. (2021). miRNA dysregulation is an emerging modulator of genomic instability. *Semin Cancer Biol*, *76*, 120-131. doi:10.1016/j.semcancer.2021.05.004
51. Cui, Y., Huang, T., Zhang, Z., Yang, Z., Hao, F., Yuan, T., & Zhou, Z. (2022). The potential effect of BMSCs with miR-27a in improving steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. *Sci Rep*, *12*(1), 21051. doi:10.1038/s41598-022-25407-8
52. Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*, *234*(5), 5451-5465. doi:10.1002/jcp.27486
53. Chen, H., Xu, Z., & Liu, D. (2019). Small non-coding RNA and colorectal cancer. *J Cell Mol Med*, *23*(5), 3050-3057. doi:10.1111/jcmm.14209
54. Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*, *87*, 3-14. doi:10.1016/j.addr.2015.05.001
55. Mahesh, G., & Biswas, R. (2019). MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *J Interferon Cytokine Res*, *39*(6), 321-330. doi:10.1089/jir.2018.0155
56. Stavast, C. J., & Erkeland, S. J. (2019). The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells*, *8*(11). doi:10.3390/cells8111465
57. Mahmoudivar, S., Zarredar, H., Asadi, M., Zafari, V., Hashemzadeh, S., Farzaneh, R., & Asvadi Kermani, T. Serum miR-23 and miR-150 Profiles as Biomarkers for Predicting Recurrence following Surgical Intervention in Colorectal Cancer Patients. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 540-549.
58. Vishnoi, A., & Rani, S. (2017). MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol*, *1509*, 1-10. doi:10.1007/978-1-4939-6524-3\_1
59. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, *11*(3), 228-234. doi:10.1038/ncb0309-228
60. Lee, C. T., Risom, T., & Strauss, W. M. (2007). Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA Cell Biol*, *26*(4), 209-218. doi:10.1089/dna.2006.0545

61. Alon, S., Mor, E., Vigneault, F., Church, G. M., Locatelli, F., Galeano, F., . . . Eisenberg, E. (2012). Systematic identification of edited microRNAs in the human brain. *Genome Res*, 22(8), 1533-1540. doi:10.1101/gr.131573.111
62. Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*, 122(1), e59. doi:10.1002/cpmb.59
63. Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 98(6), 236-238. doi:10.1136/archdischild-2013-304340
64. Kappel, A., & Keller, A. (2017). miRNA assays in the clinical laboratory: workflow, detection technologies and automation aspects. *Clin Chem Lab Med*, 55(5), 636-647. doi:10.1515/cclm-2016-0467
65. Fehlmann, T., Backes, C., Kahraman, M., Haas, J., Ludwig, N., Posch, A. E., . . . Keller, A. (2017). Web-based NGS data analysis using miRMaster: a large-scale meta-analysis of human miRNAs. *Nucleic Acids Res*, 45(15), 8731-8744. doi:10.1093/nar/gkx595
66. Ghosh, Z., Chakrabarti, J., & Mallick, B. (2007). miRNomics-The bioinformatics of microRNA genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 363(1), 6-11. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.030
67. Li, Z., Jiang, C., Li, X., Wu, W. K. K., Chen, X., Zhu, S., . . . Qian, W. (2018). Circulating microRNA signature of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. *Cell Prolif*, 51(1). doi:10.1111/cpr.12418
68. Zhang, Z., Jin, A., & Yan, D. (2018). MicroRNA-206 contributes to the progression of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head by inducing osteoblast apoptosis by suppressing programmed cell death 4. *Mol Med Rep*, 17(1), 801-808. doi:10.3892/mmr.2017.7963
69. Li, G. Q., & Wang, Z. Y. (2019). MiR-20b promotes osteocyte apoptosis in rats with steroid-induced necrosis of the femoral head through BMP signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(11), 4599-4608. doi:10.26355/eurrev\_201906\_18037
70. Zhao, J. J., Wu, Z. F., Wang, L., Feng, D. H., & Cheng, L. (2016). MicroRNA-145 Mediates Steroid-Induced Necrosis of the Femoral Head by Targeting the OPG/RANK/RANKL Signaling Pathway. *PLoS One*, 11(7), e0159805. doi:10.1371/journal.pone.0159805
71. Zhang, S., Wang, C., Shi, L., & Xue, Q. (2021). Beware of Steroid-Induced Avascular Necrosis of the Femoral Head in the Treatment of COVID-19-Experience and Lessons from the SARS Epidemic. *Drug Des Devel Ther*, 15, 983-995. doi:10.2147/DDDT.S298691
72. Nan, K., Pei, J. P., Fan, L. H., Zhang, Y. K., Zhang, X., Liu, K., . . . Wang, K. Z. (2021). Resveratrol prevents steroid-induced osteonecrosis of the femoral head via miR-146a modulation. *Ann N Y Acad Sci*, 1503(1), 23-37. doi:10.1111/nyas.14555

73. Zhang, S. Y., Wang, F., Zeng, X. J., Huang, Z., & Dong, K. F. (2021). Astragalus polysaccharide ameliorates steroid-induced osteonecrosis of femoral head through miR-206/HIF-1alpha/BNIP3 axis. *Kaohsiung J Med Sci*, 37(12), 1089-1100. doi:10.1002/kjm2.12426
74. Zhao, S. R., Wen, J. J., & Mu, H. B. (2019). Role of Hsa-miR-122-3p in steroid-induced necrosis of femoral head. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(3 Suppl), 54-59. doi:10.26355/eurrev\_201908\_18628
75. Tian, Z. J., Liu, B. Y., Zhang, Y. T., Chen, X. Z., Qiao, G. Y., Wang, S., & Ma, Z. L. (2017). MiR-145 silencing promotes steroid-induced avascular necrosis of the femoral head repair via upregulating VEGF. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 21(17), 3763-3769. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28975994>
76. Hao, C., Yang, S., Xu, W., Shen, J. K., Ye, S., Liu, X., . . . Feng, Y. (2016). MiR-708 promotes steroid-induced osteonecrosis of femoral head, suppresses osteogenic differentiation by targeting SMAD3. *Sci Rep*, 6, 22599. doi:10.1038/srep22599
77. Zha, X., Sun, B., Zhang, R., Li, C., Yan, Z., & Chen, J. (2018). Regulatory effect of microRNA-34a on osteogenesis and angiogenesis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Res*, 36(1), 417-424. doi:10.1002/jor.23613
78. Fan, J. B., Liu, W., Zhu, X. H., Cui, S. Y., Cui, Z. M., & Zhao, J. N. (2019). microRNA-7 inhibition protects human osteoblasts from dexamethasone via activation of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biochem*, 460(1-2), 113-121. doi:10.1007/s11010-019-03575-y
79. Bai, Y., Liu, Y., Jin, S., Su, K., Zhang, H., & Ma, S. (2019). Expression of microRNA-27a in a rat model of osteonecrosis of the femoral head and its association with TGF-beta/Smad7 signalling in osteoblasts. *Int J Mol Med*, 43(2), 850-860. doi:10.3892/ijmm.2018.4007
80. Dai, Z., Jin, Y., Zheng, J., Liu, K., Zhao, J., Zhang, S., . . . Sun, Z. (2019). MiR-217 promotes cell proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs by targeting DKK1 in steroid-associated osteonecrosis. *Biomed Pharmacother*, 109, 1112-1119. doi:10.1016/j.biopha.2018.10.166
81. Kang, H., Chen, H., Huang, P., Qi, J., Qian, N., Deng, L., & Guo, L. (2016). Glucocorticoids impair bone formation of bone marrow stromal stem cells by reciprocally regulating microRNA-34a-5p. *Osteoporos Int*, 27(4), 1493-1505. doi:10.1007/s00198-015-3381-x
82. Gu, C., Xu, Y., Zhang, S., Guan, H., Song, S., Wang, X., . . . Zhao, G. (2016). miR-27a attenuates adipogenesis and promotes osteogenesis in steroid-induced rat BMSCs by targeting PPARgamma and GREM1. *Sci Rep*, 6, 38491. doi:10.1038/srep38491

83. Sun, J., Wang, Y., Li, Y., & Zhao, G. (2014). Downregulation of PPARgamma by miR-548d-5p suppresses the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and enhances their osteogenic potential. *J Transl Med*, *12*, 168. doi:10.1186/1479-5876-12-168
84. Dong, Y., Li, T., Li, Y., Ren, S., Fan, J., & Weng, X. (2017). MicroRNA-23a-3p inhibitor decreases osteonecrosis incidence in a rat model. *Mol Med Rep*, *16*(6), 9331-9336. doi:10.3892/mmr.2017.7808
85. Shi, C., Huang, P., Kang, H., Hu, B., Qi, J., Jiang, M., . . . Deng, L. (2015). Glucocorticoid inhibits cell proliferation in differentiating osteoblasts by microRNA-199a targeting of WNT signaling. *J Mol Endocrinol*, *54*(3), 325-337. doi:10.1530/JME-14-0314
86. Xie, Y., Hu, J. Z., & Shi, Z. Y. (2018). MiR-181d promotes steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by targeting SMAD3 to inhibit osteogenic differentiation of hBMSCs. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *22*(13), 4053-4062. doi:10.26355/eurrev\_201807\_15393
87. Fan, J. B., Liu, W., Zhu, X. H., Yi, H., Cui, S. Y., Zhao, J. N., & Cui, Z. M. (2017). microRNA-25 targets PKCzeta and protects osteoblastic cells from dexamethasone via activating AMPK signaling. *Oncotarget*, *8*(2), 3226-3236. doi:10.18632/oncotarget.13698
88. Fan, J. B., Ruan, J. W., Liu, W., Zhu, L. Q., Zhu, X. H., Yi, H., . . . Cui, Z. M. (2016). miR-135b expression downregulates Ppm1e to activate AMPK signaling and protect osteoblastic cells from dexamethasone. *Oncotarget*, *7*(43), 70613-70622. doi:10.18632/oncotarget.12138
89. Shi, C., Qi, J., Huang, P., Jiang, M., Zhou, Q., Zhou, H., . . . Deng, L. (2014). MicroRNA-17/20a inhibits glucocorticoid-induced osteoclast differentiation and function through targeting RANKL expression in osteoblast cells. *Bone*, *68*, 67-75. doi:10.1016/j.bone.2014.08.004
90. Degterev, A., Ofengeim, D., & Yuan, J. (2019). Targeting RIPK1 for the treatment of human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(20), 9714-9722. doi:10.1073/pnas.1901179116
91. Fan, X., Xu, X., Wu, X., Xia, R., Gao, F., Zhang, Q., & Sun, W. (2022). The protective effect of DNA aptamer on osteonecrosis of the femoral head by alleviating TNF-alpha-mediated necroptosis via RIP1/RIP3/MLKL pathway. *J Orthop Translat*, *36*, 44-51. doi:10.1016/j.jot.2022.07.001
92. Zhang, T., Xu, D., Trefts, E., Lv, M., Inuzuka, H., Song, G., . . . Wei, W. (2023). Metabolic orchestration of cell death by AMPK-mediated phosphorylation of RIPK1. *Science*, *380*(6652), 1372-1380. doi:10.1126/science.abn1725

93. Yuan, J., Amin, P., & Ofengeim, D. (2019). Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases. *Nat Rev Neurosci*, 20(1), 19-33. doi:10.1038/s41583-018-0093-1
94. Wang, B., Gong, S., Han, L., Shao, W., Li, Z., Xu, J., . . . Feng, Y. (2022). Knockdown of HDAC9 Inhibits Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Partially by Suppressing the MAPK Signaling Pathway. *Clin Interv Aging*, 17, 777-787. doi:10.2147/CIA.S361008
95. Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(1), 50-83. doi:10.1128/MMBR.00031-10
96. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22(2), 153-183. doi:10.1210/edrv.22.2.0428
97. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-1934. doi:10.1126/science.1075762
98. Garcia, F. A. O., de Andrade, E. S., & Palmero, E. I. (2022). Insights on variant analysis in silico tools for pathogenicity prediction. *Front Genet*, 13, 1010327. doi:10.3389/fgene.2022.1010327
99. He, X. H., Xiao, Y. T., Chen, W. Y., Wang, M. J., Wu, X. D., Mei, L. Y., . . . Chen, X. M. (2023). In silico analysis of serum miRNA profiles in seronegative and seropositive rheumatoid arthritis patients by small RNA sequencing. *PeerJ*, 11, e15690. doi:10.7717/peerj.15690
100. Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue), D154-158. doi:10.1093/nar/gkm952
101. Moh, N. M. M., Zhang, P., Chen, Y., & Chen, M. (2021). Computational Identification of miRNAs and Temperature-Responsive lncRNAs From Mango (*Mangifera indica* L.). *Front Genet*, 12, 607248. doi:10.3389/fgene.2021.607248
102. Kruger, J., & Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res*, 34(Web Server issue), W451-454. doi:10.1093/nar/gkl243
103. Akhtar, M. M., Micolucci, L., Islam, M. S., Olivieri, F., & Procopio, A. D. (2015). Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Research*, 44(1), 24-44. doi:10.1093/nar/gkv1221
104. Marakli, S. (2018). Identification and functional analyses of new sesame miRNAs (*Sesamum indicum* L.) and their targets. *Mol Biol Rep*, 45(6), 2145-2155. doi:10.1007/s11033-018-4373-7

105. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*, 38(7), 3022-3027. doi:10.1093/molbev/msab120
106. Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., & Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res*, 51(D1), D587-D592. doi:10.1093/nar/gkac963
107. Chen, L., Zhang, Y. H., Wang, S., Zhang, Y., Huang, T., & Cai, Y. D. (2017). Prediction and analysis of essential genes using the enrichments of gene ontology and KEGG pathways. *PLoS One*, 12(9), e0184129. doi:10.1371/journal.pone.0184129
108. Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 27-30. doi:10.1093/nar/28.1.27
109. Song, J., Li, J., Pei, X., Chen, J., & Wang, L. (2024). Identification of cuproptosis-related key genes and pathways in Parkinson's disease via bioinformatics analysis. *PLoS One*, 19(4), e0299898.
110. Litwiniuk-Kosmala, M., Makuszevska, M., Niemczyk, K., Bartoszewicz, R., Wojtas, B., & Gielniewski, B. (2024). High-throughput RNA sequencing identifies the miRNA expression profile, target genes, and molecular pathways contributing to growth of sporadic vestibular schwannomas. *Acta Neurochirurgica*, 166(1), 1-9.
111. Kramer, M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 15, Unit 15 10. doi:10.1002/0471142727.mb1510s95
112. Mahmoudivar, S., Zarredar, H., Asadi, M., Zafari, V., Hashemzadeh, S., Farzaneh, R., & Asvadi Kermani, T. Serum miR-23 and miR-150 Profiles as Biomarkers for Predicting Recurrence following Surgical Intervention in Colorectal Cancer Patients. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 540-549.
113. Adhikari, S., Turner, M., & Subramanian, S. (2013). Hairpin priming is better suited than in vitro polyadenylation to generate cDNA for plant miRNA qPCR. *Molecular plant*, 6(1), 229-231.
114. Harshitha, R., & Arunraj, D. R. (2021). Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ*, 49(5), 800-812. doi:10.1002/bmb.21552
115. Trick, A. Y., Chen, F. E., Schares, J. A., Freml, B. E., Lor, P., Yun, Y., & Wang, T. H. (2021). High resolution estimates of relative gene abundance with quantitative ratiometric regression PCR (qRR-PCR). *Analyst*, 146(21), 6463-6469. doi:10.1039/d1an01397a
116. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.

117. Mahanama, A., & Wilson-Davies, E. (2021). Insight into PCR testing for surgeons. *Surgery (Oxf)*, 39(11), 759-768. doi:10.1016/j.mpsur.2021.09.016
118. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3(3), 71-85. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558171>
119. Shi, W., Zhang, X., Xu, C., Pang, R., Fan, Z., Wan, X., . . . Zhang, H. (2022). Identification of Hub Genes and Pathways Associated with Oxidative Stress of Cartilage in Osteonecrosis of Femoral Head Using Bioinformatics Analysis. *Cartilage*, 13(1), 19476035221074000. doi:10.1177/19476035221074000
120. Lin, T., Chen, W., Yang, P., Li, Z., Wei, Q., Liang, D., . . . Zhang, Q. (2021). Bioinformatics analysis and identification of genes and molecular pathways in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 16(1), 327.
121. Fan, X., Xu, X., Wu, X., Xia, R., Gao, F., Zhang, Q., & Sun, W. (2022). The protective effect of DNA aptamer on osteonecrosis of the femoral head by alleviating TNF- $\alpha$ -mediated necroptosis via RIP1/RIP3/MLKL pathway. *Journal of Orthopaedic Translation*, 36, 44-51.
122. Miao, Q., Hao, S., Li, H., Sun, F., & Wang, X. (2015). Expression of osteoprotegerin, RANK and RANKL genes in femoral head avascular necrosis and related signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(9), 10460-10467. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617755>
123. Yuan, H.-f., Von Roemeling, C., Zhang, J., Guo, C.-a., & Yan, Z.-q. (2015). Analysis of altered microRNA expression profile in the reparative interface of the femoral head with osteonecrosis. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(2), 158-163.
124. Wei, B., Wei, W., Wang, L., & Zhao, B. (2018). Differentially expressed microRNAs in conservatively treated nontraumatic osteonecrosis compared with healthy controls. *BioMed Research International*, 2018.
125. Zhang, M., Chen, D., Zhang, F., Zhang, G., Wang, Y., Zhang, Q., . . . Chen, P. (2020). Serum exosomal hsa-miR-135b-5p serves as a potential diagnostic biomarker in steroid-induced osteonecrosis of femoral head. *Am J Transl Res*, 12(5), 2136-2154. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32509207>
126. Zhang, G., Chen, L., Guo, X., Wang, H., Chen, W., Wu, G., . . . Jin, X. (2018). Comparative analysis of microRNA expression profiles of exosomes derived from normal and hypoxic preconditioning human neural stem cells by next generation sequencing. *Journal of biomedical nanotechnology*, 14(6), 1075-1089.
127. Abd ELhafeez, A. S., Ghanem, H. M., Swellam, M., & Taha, A. M. (2023). Involvement of FAM170B-AS1, hsa-miR-1202, and hsa-miR-146a-5p in breast cancer. *Cancer Biomarkers*(Preprint), 1-21.

128. Takashima, Y., Kawaguchi, A., Iwadate, Y., Hondoh, H., Fukai, J., Kajiwara, K., . . . Yamanaka, R. (2020). miR-101, miR-548b, miR-554, and miR-1202 are reliable prognosis predictors of the miRNAs associated with cancer immunity in primary central nervous system lymphoma. *PLoS One*, *15*(2), e0229577.
129. Zhu, J., Ma, X., Zhang, Y., Ni, D., Ai, Q., Li, H., & Zhang, X. (2016). Establishment of a miRNA-mRNA regulatory network in metastatic renal cell carcinoma and screening of potential therapeutic targets. *Tumor Biology*, *37*, 15649-15663.
130. Yu, Y., Jia, Y.-Y., Wang, M., Mu, L., & Li, H.-J. (2021). PTGER3 and MMP-2 play potential roles in diabetic nephropathy via competing endogenous RNA mechanisms. *BMC nephrology*, *22*, 1-11.
131. Lee, T.-Y., Tseng, C.-J., Wang, J.-W., Wu, C.-P., Chung, C.-Y., Tseng, T.-T., & Lee, S.-C. (2023). Anti-microRNA-1976 as a novel approach to enhance chemosensitivity in XAF1+ pancreatic and liver cancer. *Biomedicines*, *11*(4), 1136.



**EKLER**

## EK-1 Amasya Üniversitesi Girişimsel olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 04.05.2023-129039



T.C.  
AMASYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-76988455-050.01.04-129039  
Konu : Etik Kurul Onayı

04.05.2023

**Sayın Prof. Dr. Tuba YILDIRIM**  
**Öğretim Üyesi**

İlgi : a) 20.02.2023 tarihli ve 2023000039 numaralı online başvurunuz.  
b) 14.04.2023 tarihli ve 2023000039-1 numaralı online düzeltme başvurunuz.

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Öğretim Üyeleri Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fikriye Milletli SEZGİN, Cerrahi Tıp Bilimleri Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hicabi SEZGİN ile Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde öğrenim gören Moleküler Tıp Bölümü Yüksek Lisans Programı öğrencisi ve Çorum Şehit Mustafa Solak Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi'nde görev yapan Biyoloji Öğretmeni Didem HIZARBAŞ ile işbirliğinizde yapılması planlanan "Steroid Kaynaklı Femur Başı Avasküler Nekrozlu Hastalarda miRNA'ların Belirlenmesi" konulu çalışma Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulumuz tarafından incelenmiştir.

Söz konusu çalışmanın yürütülmesinin ve uygulanmasının etik olarak uygun olduğu kanaatine varılmış olup, Kurul Kararının bir örneği ilişikte gönderilmiştir.  
Bilgilerinizi rica ederim.

**Dr. Öğr. Üyesi Safiye TEMEL**  
**Etik Kurul Başkanı V.**

Ek:Kurul Kararı (1 Sayfa)

**Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.**

Belge Doğrulama Kodu :BSVBSF6HNS Pin Kodu :94292

Belge Takip Adresi :  
<https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5544&eD=BSVBSF6HNS&eS=129039>


Adres:Akbilek Mah. Hakimiyet Cad. No:4/3 P.K. :05100 Merkez/Amasya  
Telefon:0 (358) 211 5005 Faks:0 (358) 218 01 04  
e-Posta:genelsekretelik@amasya.edu.tr Web:http://www.amasya.edu.tr/  
Kep Adresi:amasyauniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için: Dilek  
BÜYÜKBAYRAKTAR  
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni  
Tel No: (358)2115011



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

## EK-2 Amasya Üniversitesi Girişimsel olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul kararı

	<b>T.C.</b> <b>AMASYA ÜNİVERSİTESİ</b> <b>GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b> <b>KURUL KARAR FORMU</b>	
	<b>Toplantı Tarihi</b> 04 Mayıs 2023	<b>Toplantı Sayısı</b> 08

**KARAR NO 39:**

- Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tuba YILDIRIM'ın yürütücülüğünde olan ve Yardımcı Araştırmacı olarak yer alan Amasya Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyeleri Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fikriye Milletli SEZGIN, Cerrahi Tıp Bilimleri Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hicabi SEZGIN ile Amasya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde öğrenim gören Moleküler Tıp Bölümü Yüksek Lisans Programı öğrencisi ve Çorum Şehit Mustafa Solak Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi'nde görev yapan Biyoloji Öğretmeni Didem HIZARBAŞ'ın işbirliğinde yapılması öngörülen "*Steroid Kaynaklı Femur Başı Avasküler Nekrozlu Hastalarda miRNA'ların Belirlenmesi*" konulu tez çalışması, Kurul tarafından proje araştırma etiği yönünden değerlendirildi ve incelendi.

Söz konusu tez çalışmasının yürütülmesinin ve uygulanmasının etik olarak uygun olduğuna katılanların oybirliğiyle karar verildi.

		KABUL	RED
<b>BAŞKAN V.</b>	Dr. Öğr. Üyesi Safiye TEMEL	İMZA	
<b>BAŞKAN YARDIMCISI</b>	Dr. Öğr. Üyesi Safiye TEMEL	İMZA	
<b>RAPORTÖR</b>	Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ	İMZA	
<b>ÜYELER</b>	Doç. Dr. Kenan GÜMÜŞ	İMZA	
	Doç. Dr. Banuhan ŞAHİN	İZİNLİ	
	Doç. Dr. Burak YAZGAN	İMZA	
	Dr. Öğr. Üyesi Nurdan KARPUZ	İMZA	
	Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN	İMZA	
	Dr. Öğr. Üyesi Aslı KURTGÖZ	KATILMADI	
	Dr. Öğr. Üyesi Neşe YAKŞI	İMZA	
	Dr. Öğr. Üyesi Hanife KARA	İMZA	

KYT-FRM-265/00

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Didem HIZARBAŞ

Doğum Yeri:

Doğum Tarihi:

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Ege Üniversitesi - Fen Fakültesi - Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Amasya Üniversitesi – Sağlık Bilimleri Enstitüsü – Moleküler

Tıp Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Bildiriler (Uluslararası –Ulusal): 12. Uluslararası Geyher Nesibe Sağlık Bilimleri Konferansı - Steroid Kaynaklı Femur Başı Avasküler Nekrozunda miRNA Hedeflerinin *in siliko* Yöntemler ile Belirlenmesi - 2024

Projeler: Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) - Multiple Skleroz Hastalarında Tanı Biyobelirteçleri Olabilecek Isı Şok Proteinleri (HSP'ler) ve İlişkili miRNA Profillerinin Belirlenmesi - 2024

### İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve yıl: MEB – Biyoloji Öğretmeni- 23

### İLETİŞİM

E-posta Adresi: