

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



Beyaz Önlük Hipertansiyonu ve Esansiyel Hipertansiyonda
miR-125a ve miR-155 düzeylerin araştırılması

İÇ HASTALIKLARI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI:

Prof. Dr. Adnan Levent YALDIRAN

Dr. Chayar ALİ

İSTANBUL -2015



TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitim sürem boyunca, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım başta İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Teoman SOYSAL olmak üzere tüm değerli hocalarıma,

Tezimin her aşamasında desteğini ve bilgisini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Adnan Levent YALDIRAN 'a

Tez konumu belirlememde ve hazırlamamda ve istatistiğimin yapılmasında desteğini esirgemeyen Uzm. Dr. Mahir CENGİZ ve Uzm. Dr. Serap YAVUZER 'e

Tezimi hazırlarken yanımda olup yardımları için arkadaşım Tuba Elif ŐENEL 'e

Daima yanımda olan, sabrı ve emeği ile bugünlere gelmemi sağlayan canım annem ve babama, kardeşlerime ve biricik eşime

En içten teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İçindekiler

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
KISALTMALAR.....	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	x
Giriş ve Genel Bilgiler.....	1
Amaç.....	4
Materiyal ve Metod.....	5
Çalışma Populasyonu.....	5
Kan Basıncı Ölçümü.....	6
Kan Örneklerinin Toplanması ve RNA İzolasyonu.....	6
Serum Örneklerinden RNA Ayırıştırılması	6
cDNA sentezi ve Kantitatif Real-Time PCR	7
İstatistiksel Hesap	7
Bulgular	8
Tartışma	14
Kaynaklar.....	23

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Çalışma gruplarının demografik verileri ve laboratuvar sonuçları.

Tablo 2. Çalışma gruplarının demografik verileri ve laboratuvar sonuçları.

Tablo 3. Çalışma gruplarının klinik ve ambulatuvar kan basıncı ölçümleri.

Tablo 4. Çalışma gruplarında miR-125a ve miR-155'in ekspresyon seviyeleri.



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Çalışma gruplarında miR-125a'in ekspresyon seviyeleri.

Şekil 2. Çalışma gruplarında miR-155'in ekspresyon seviyeleri.

Şekil 3. Çalışmaya alınan tüm bireylerin miR-125a ile miR-155 düzeyleri arasındaki ilişki.

Şekil 4. Çalışmaya alınan tüm bireylerin bel çevresi ile miR-155 düzeyleri arasındaki ilişki.



KISALTMALAR

AKBÖ: Ambulatuvar Kan Basıncı Ölçümü

AT1: Anjiotensin II reseptör tip 1

BÖH: Beyaz Önlük Hipertansiyon

c DNA: Complementary DNA, tamamlayıcı DNA

DKB: Diastolik Kan Basıncı

eNOS: endotelisel Nitrik Oksid Sentaz

ETA: Endotelin reseptör A

ETB: Endotelin reseptör B

ETDA: Etilendiamin Tetra asetik Asit

HbA1C: Hemoglobin A1C, Glikolize Hemoglobin

HDL: High Density Lipoprotein

HT: Hipertansiyon

LDL: Low Density Lipoprotein

miRNA: mikro RNA

NO: Nitrik oksit

RAAS: Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi

SKB: Sitotoksik Kan Basıncı

TNF-a: Tümör Nekrozis Faktör- a

TSH: Tiroid Stimule eden Hormon

VKİ: Vucut Kitle İndeksi

ÖZET

Amaç: Beyaz önlük hipertansiyonu (BÖH) yüksek kardiyovasküler risk faktörü olup, hastalığın sebebi ve patofizyolojisi iyi bilinmemektedir. Çalışmamızın birinci amacı; hipertansiyon ile epigenetik ve moleküler ilişkisi daha önce gösterilmiş mikroRNAlardan miR-125a ve miR-155'in plazma ekspresyon seviyelerini BÖH, hipertansiyon ve normotansif hasta gruplarında araştırmak ve karşılaştırmaktır. Çalışmamızın ikinci amacı; bu mikroRNA seviyelerinin klinik ve ambulatuvar kan basıncı ölçümleri ile ilişkisini değerlendirmektir.

Yöntem: Seçilmiş iki mikroRNA miR-125a ve miR-155 30 hipertansif ve 30 BÖH'lü hastalar ile 30 normotansif sağlıklı kontrolde çalışıldı. miR-125a ve miR-155'lerin ekspresyon düzeyleri kantitatif qRT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) ile analiz edildi.

Bulgular: Çalışmaya alınan gruplar arasında miR-125a ve miR-155 ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmadı. Tüm gruplar içerisinde miR-125a ile miR-155 ($r=0,861$, $p<0,001$) arasında anlamlı olarak aynı yönde korelasyon saptandı. miR-125a ile klinik, labaratuvar ve kan basıncı ölçümleri arasında ilişki görülmedi. miR-155 ile bel çevresi arasında anlamlı olarak ters yönde korelasyon saptandı. miR-155 ile diğer klinik, labaratuvar ve kan basıncı ölçümleri arasında ilişki görülmedi.

Tartışma: Bu çalışmada hipertansiyon ve BÖH'ün etiyopatogenezine epigenetik yönden araştırmayı amaçladık. Bulduğumuz sonuçlar literatür verileri ile uyumlu idi. Ancak vaka sayısının az olması nedeni ile istatistiksel anlamlı bir ilişki saptamadık. Hipertansiyon ve BÖH hastalarının mikroRNA ekspresyon düzeylerinin tutarlı olduğu ve aynı yönde değişim gösterdiği görülmüştür. Bu sonuçlar hipertansiyon ve BÖH'ü

anlamamıza yönelik mikroRNA'ların önemli etkileri olabileceğine işaret etmektedir. Gelecekte mikroRNA'lar hipertansiyon ve BÖH'lü hastaların tanı, tedavi ve takiplerine önemli katkılar sağlayabileceğini ve klinik kullanıma girebileceğini düşünmekteyiz.



ABSTRACT

Background— White coat hypertension (WCH) is a high cardiovascular risk condition and a fundamental understanding of the cause and pathophysiology of the disorder is still lacking. Recent studies demonstrated that microRNAs (miRNAs) are involved in hypertension. However, the roles of miRNAs in WCH are not known. The first aim of this study was to investigate the levels of miR-125a and miR-155 plasma expression levels in the WCH, hypertension (HT) and normotensive(NT) groups and compare the levels between the groups. The second aim was to evaluate the relationships between these miRNA levels and the measurements of clinical and ambulatory blood pressures.

Methods- The expressions of miR-125a and miR155 were validated independently in plasma samples from 30 HT patients, 30 WCH and 30 NT healthy subjects. The expression levels were analyzed by quantitative reverse transcription-PCR.

Results- There was found any significant difference according to the expression levels of miR-125a and miR-155 between all the groups. miR-125a levels were significantly positively correlated with miR-155 levels in all groups ($r=0,861$, $p<0,001$). No significant differences were observed between the levels of miR-125a and laboratory findings, clinical and ambulatory blood pressure measurements. The levels of miR-155 were only significantly negatively correlated with the measurements of waist circumference.

Conclusions- Our results were correlated with the literature, however we could not determine statistically significant relationships because of the small number of groups. It was observed that the miRNAs expression levels were positively correlated between HT and WCH patient. These results suggest that the miRNAs might have important role in the epigenetic aspect of etiopathogenesis of HT and WCH for our understanding.

Giriş ve Genel Bilgiler

Hipertansiyon kardiyovasküler, serebrovasküler ve böbrek hastalıkları için en önemli değiştirilebilir risk faktörü olup, yüksek prevalansı nedeniyle dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur(1). Yüksek arteriyel kan basıncına kronik maruziyet, uç-organ hasarına neden olarak doku ve organlarda yapısal ve işlevsel değişikliklerin gelişmesi sonucu hipertansiyonla ilişkili morbidite ve mortaliteye sebep olmaktadır(2). Hipertansiyon patogenezinde suçlanan mekanizmalar renin-anjiyotensin-aldosteron sistemin aşırı aktivasyonu, sempatik sinir sisteminin aşırı duyarlılığı, endotel disfonksiyonu, oksidatif stres ve bozulmuş anjiyogenezistir. Ancak esansiyel hipertansiyonun moleküler patofizyolojisi hala net olarak aydınlatılamamıştır.

Beyaz önlük hipertansiyonu (BÖH) ilk kez 1988 yılında Thomas Pickering tarafından ofis kan basıncı ölçümlerinin yüksek olmasına rağmen, ev tansiyon ölçümlerinin normal olması olarak tanımlanmıştır(3). Bu hastaların normotansif popülasyona göre artmış bir kardiyovasküler risk faktörü olduğu ise ilk günden beri çok iyi bilinmektedir. Avrupa Hipertansiyon Derneği ve Avrupa Kardiyoloji Derneği'nin 2013 yılında güncellenen hipertansiyon tanı ve tedavi kılavuzunda; hekim tarafından ölçülen 3 ofis tansiyonunun $\geq 140/90$ mmHg ve 24 saatlik ambulatuvar kan basıncı ölçümünün $\leq 130/80$ mmHg veya gün içi ambulatuvar kan basıncı ölçümünün $\leq 135/85$ mmHg veya ev kan basıncı takiplerinin normal ($\leq 130-135/85$ mmHg) olması BÖH olarak tanımlanmıştır(4). 2014 yılında yayınlanan Ulusal Komite Birliği-8 (JNS-8) kılavuzunda da BÖH tanımında bir değişiklik yapılmamıştır(5).

Hipertansif hastalarda uç organ hasarını araştırmak için göz dibi incelemesi, mikroalbüminüri, sol ventrikül kütle indeksi ve karotis intima media kalınlığı ölçümleri gibi parametrelerle değerlendirilmektedir. PAMELA ve arkadaşları ile Karter ve

arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda BÖH hastalarında normotansiflere göre sol ventrikül kütle indeksinin arttığı fakat bu artışın hipertansif hastalardaki kadar olmadığı görülmüştür(6, 7). Mikroalbuminüri değerleri açısından değerlendirildiğinde ise iki çalışmada da BÖH ile normotansifler arasında fark bulunmamıştır(6, 7). HARVEST çalışmasında erken evre hipertansif hastalar ve normotansif kişiler, atherosklerozun progresyonunu değerlendirmek amacıyla 5 yıl süre boyunca karotis intima media kalınlığı ölçümleri yapılarak takibe alınmış. BÖH'lü hastalardaki karotis intima media kalınlığı değerleri normotansiflere göre hem çalışmanın başlangıcında ve de 5 yılın sonunda daha yüksek bulunmuş hem de kalınlığın daha hızlı arttığı görülmüştür. Fakat BÖH ile hipertansif hastaların karotis intima kalınlıkları başlangıçta ve 5 yılın sonunda karşılaştırıldığında bir farklılık olmadığı görülmüştür(8). Normotansif kişiler ile kıyaslandığında BÖH olan bireylerde, hipertansiyon, metabolik sendrom ve diyabetes mellitus sıklığının daha fazla olduğu bilinmektedir.

BÖH'lü hastalardaki kardiyovasküler hastalık ve inme riski, normotansiflere göre hafif artmış olsa da hipertansif ve maskeli hipertansiyonu olan hastalar kadar artmamıştır(9, 10). Japonya'da yapılan OHASAMA çalışmasında BÖH hastalarının 10 yıl süre ile takibinde inme riskinde normotansiflere göre artış olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır(9). Pierdomenico ve arkadaşlarının kardiyak ve serebrovasküler riski değerlendirmek için yaptığı çalışmada 1732 hasta 6 yıl süre ile takip edilmiş. Hipertansif hastalarda kardiyak ve serebrovasküler riskin BÖH'lü hastalara kıyasla daha fazla olduğu, BÖH ile normotansif hastalar arasında fark olmadığı fakat BÖH hastalarının normotansiflere göre takip süresinde daha fazla antihipertansif tedaviye ihtiyaç duyduğu saptanmıştır(10). BÖH pre-hipertansif bir durum olup, hipertansiyon gelişim riski oldukça yüksektir. Yapılan bir diğer çalışmada

81 BÖH hastasının 6 yıl süre ile takibi sonucunda hastaların %74'ünde (medyan 2,5 yıl) hipertansiyon geliştiği bildirilmiştir(11). BÖH'ün de hipertansiyon gibi etiyo-patogenezi tam olarak bilinmemektedir ve multifaktöryel etkenlerin sebep olduğu olduğu düşünülmektedir.

MikroRNA'lar (miRNA) küçük, kodlama yapmayan ve ~21-23 bp uzunluğunda RNA molekülleridir. MiRNA'lar mRNA'yı uyarmak veya post-transkripsiyonel olarak mRNA'yı inhibe ya da degrade ederek etkinliklerini göstermektedir. MiRNA'ların rolü bir çok hastalıkta (diyabetes mellitus, metabolik sendrom ve kanser) iyi bilinse de kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyon ile ilgili veriler oldukça yetersizdir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda miRNA'ların hipertansiyonun etiyo-patogenezinde önemli rollerinin olabileceğini düşündürmektedir. Yu LP ve arkadaşları yaptığı çalışmada hipertansif ve sağlıklı gönüllülerde bakılan 1700 miRNA arasında 46 miRNA anlamlı olarak farklı bulunmuş(12). Ancak literatürde BÖH' ün epigenetik etiyo-patogenezi üzerine yapılmış her hangi bir veri yoktur.

Amaç

Çalışmamızın birinci amacı; hipertansiyon ile epigenetik ve moleküler ilişkisi daha önce gösterilmiş mikroRNAlardan miR-125a ve miR-155'in BÖH un epigenetik etiyolojisi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla plazma ekspresyon seviyelerini BÖH, hipertansiyon ve normotansif hasta gruplarında araştırmak ve gruplar arası karşılaştırmaktır. Çalışmamızın ikinci amacı; bu mikroRNA seviyelerinin klinik ve ambulator kan basıncı ölçümleri ile ilişkisini değerlendirmektir.



Materiyal ve Metod

Çalışmaya alınan her hastaya ve kontrol grubundaki gönüllülere araştırmanın kapsamı hakkında bilgi verildikten sonra katılım için yazılı onamları alınmıştır. Çalışmanın Helsinki ilkelerine uygunluğu İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve etik kurul onamı alınmıştır. (Tarih: 04\03\2014, sayı:6014).

Çalışma Populasyonu

Çalışmaya Ocak 2014 ile Haziran 2014 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıklar Ana Bilim Dalı, Genel Dahiliye polikliniğine başvuran 30 BÖH (10 erkek, 20 kadın; yaş ortalaması $45,3 \pm 7,1$ yıl) ve 30 yeni tanı hipertansiyon hastası (13 erkek, 17 kadın; yaş ortalaması $47,2 \pm 5,4$ yıl) dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak herhangi bir hastalığı olmayan 30 normotansif sağlıklı gönüllü (10 erkek, 20 kadın; yaş ortalaması $44,2 \pm 5,7$ yıl) alınmıştır.

Brakiyal arteriyel basıncı; aynı doktor tarafından ardışık 2 gün içinde 3'er kez ölçülerek gerçekleştirilmiş ve ölçümlerin ortalaması sistolik kan basıncı (SKB) ve diyastolik kan basıncı (DKB) olarak kayıt edilmiştir.

Atheroskleroz için risk taşıyan ($LDL > 130$ mg/dl, diyabetes mellitus, metabolik sendrom, vücut kitle indeksi $VKI > 27$ kg/m^2 , sigara ve alkol kullanan), aterosklerotik vasküler hastalık, uyku apnesi sendromu, kronik obstruktif akciğer hastalığı, astım, malignite, romatolojik ve endokrin hastalıkların belirti ve bulgularını taşıyanlar çalışmaya dahil edilmemiştir. Polikliniğimize başvurmadan önceki herhangi bir zamanda lipit metabolizmasını etkileyen (statin ve fibratlar) ve antioksidan ajanlar kullananlar çalışmadan çıkarılmıştır.

Kan Basıncı Ölçümü

24 saatlik ambulatuvar kan basıncı ölçümü, çalışmaya alınan tüm bireylere uygulanmıştır. Ölçümler Avrupa Hipertansiyon Cemiyeti'nce onaylı Schiller marka, BR-102 cihazı ile sol koldan yapılmıştır(13). Avrupa Hipertansiyon Derneği ve Avrupa Kardiyoloji Derneği'nin sınıflandırmasına göre 24 saatlik Ambulatuvar Kan Basıncı Ölçümü (AKBÖ) $\geq 130/80$ mm Hg ve/veya gün içi AKBÖ $\geq 135/85$ mm Hg olması hipertansiyon olarak değerlendirildi(4).

Kan Örneklerinin Toplanması ve RNA İzolasyonu

Tüm kan örnekleri 12 saat açlık sonrasında sabah aç olarak Etilendiamin Tetra asetik asit (ETDA) içeren vakumlu tüplere alındı. Serum örnekleri alındıktan sonra İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda 4°C sıcaklıkta 3000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek beyaz ve kırmızı kan hücreleri serumdan uzaklaştırıldı, serumlar 2 ml'lik alikotlar halinde RNA ayrıştırması yapılabildiği kadar -80°C buzdolabında saklandı.

Serum Örneklerinden RNA Ayrıştırılması

30 hipertansiyon, 30 BÖH ve 30 kontrolden alınan tüm kan örneklerin her birisinden 400 µL kullanılarak miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) yardımıyla total RNA ayrıştırılması üretici firmanın protokolüne uyularak yapıldı. RNA saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop ND-2000c kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Thermo Fisher Scientific, Inc, Wilmington, DE).

cDNA sentezi ve Kantitatif Real-Time PCR

Her örneğin toplam RNA'sından alınan 2 uL ile ilk standart DNA sentezi (cDNA) "miScript II RT Kit" kullanılarak Qiagen firmasının protokolüne uygun olarak yapıldı. MiRNA'ların ekspresyon seviyelerini takip etmek için Custom miScript miRNA PCR Array (Qiagen) kullanıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda hipertansiyon ile ilişkisi saptanmış miR-125a(14) ve miR-155(15) çalışıldı. MiRNA'ların ekspresyon düzeylerini normalize etmek için RNU6B kullanıldı. Kantitatif qRT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) oluşturulması için Roche LightCycler 480-II real-time cycler (Roche, Basel, Switzerland) kullanıldı ve her örnek için 2 kez çalışıldı. Rölatif ekspresyon seviyelerini analiz etmek için daha önce ki çalışmalarda kullanılan delta-delta-CT metodu kullanıldı(16).

İstatistiksel Hesap

Çalışmamızda BÖH ile çalıştığımız miRNA ların ortalama rölatif ekspresyon düzeyleri arasındaki anlamlı bir fark bulabilmemiz için çalışma başlamadan önce yapılan güç analizinde %80 güç (2-taraf %5 anlamlılık) için gereken asgari hasta sayısı 56 (28 hasta her grup için) olarak bulundu. Tüm veriler Windows 22.0 versiyon için düzenlenen SPSS software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) kullanılarak analiz edildi. Devamlılık gösteren değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmasında one-way ANOVA (Analysis of Variance) testi kullanıldı. Takibindeki post hoc değerlendirme ise Bonferroni metodu kullanılarak yapıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ise Ki-kare testi veya Fisher exact testi uygulandı. Sayısal verilerin korelasyonunda Pearson, kategorik değişkenlerin korelasyonunda Spearman yöntemleri kullanıldı. p değeri < 0,05 ise istatistik olarak anlamlı kabul edildi. Devamlılık gösteren değerler ortalama ve standart sapma şeklinde verildi.

Bulgular

Çalışmaya alınan 30 BÖH (20 kadın, 10 erkek) hastasının yaş ortalaması $45,3\pm 7,1$, hipertansiyon (17 erkek, 13 kadın) hastasının yaş ortalaması $47,2\pm 5,4$ iken, 30 sağlıklı kontrolün yaş ortalaması $44,3\pm 5,7$ idi. Çalışma gruplarının demografik verileri Tablo 1’de verilmiştir. Gruplar arasında yaş, cinsiyet dağılımı, vücut kitle indeksi ve bel çevresi ölçümlerinde fark saptanmamıştır.

Tablo 1. Çalışma gruplarının demografik verileri ve labaratuvar sonuçları.

	Kontrol (n=30)	BÖH (n=30)	Hipertansiyon (n=30)	P
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	20/10	20/10	17/13	0,65
Yaş (yıl)	$44,3\pm 5,7$	$45,3\pm 7,1$	$47,2\pm 5,4$	0,164
Vücut kitle indeksi (kg/m^2)	$23,6\pm 61,1$	$23,8\pm 1,3$	$23,7\pm 1,4$	0,772
Bel çevresi (cm)	$85,3\pm 6,7$	$85\pm 5,2$	$83,1\pm 4,5$	0,239

Gruplar arasında glukoz, HbA_{1c}, total kolesterol, HDL, LDL, trigliserid, tiroid stimulator hormon, kreatinin ve kreatinin klirensi değerleri karşılaştırıldığında fark görülmemiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışma gruplarının demografik verileri ve laboratuvar sonuçları.

	Kontrol (n=30)	BÖH (n=30)	Hipertansiyon (n=30)	p
Glukoz (mg/dl)	85,5±5,2	88,2±9,2	88,8±7,7	0,158
Hemoglobin A_{1c} (%)	5,2±0,4	5,3±0,3	5,4±0,3	0,134
Total kolesterol (mg/dl)	176,8±23	182,8±16,1	181,16,5±	0,408
HDL (mg/dl)	58,9±13,2	53,6±10,7	53,2±11,2	0,117
LDL (mg/dl)	105,6±20,9	111,8±10,4	110,8±17	0,302
Trigliserid (mg/dl)	91,1±29,1	103,2±28,7	96,3±34,1	0,319
TSH (µIU/ml)	2,2±1,1	1,9±1,1	1,9±0,9	0,523
Kreatinin (mg/dl)	0,7±0,2	0,8±0,1	0,8±0,2	0,439
Kreatinin klirensi (ml/dk)	111,4±31,4	123,1±29,4	117,4±27,6	0,320

Çalışma gruplarının klinik ve ambulatuvar kan basıncı ölçümleri Tablo 3’de verilmiştir. Klinik SKB ve DKB ölçümleri kontrol grubunda anlamlı olarak en düşük saptanmıştır (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,001$). 24 saatlik, gün içi ve gece SKB ve DKB ölçümleri anlamlı olarak hipertansiyon grubunda yüksek saptandı (hepsi için $p<0,001$).

Tablo 3. Çalışma gruplarının klinik ve ambulatuvar kan basıncı ölçümleri.

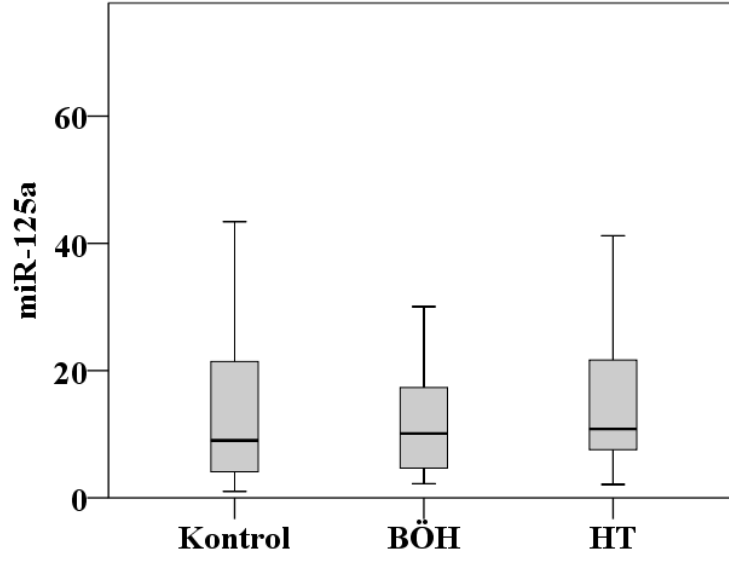
	Kontrol (n=30)	BÖH (n=30)	Hipertansiyon (n=30)	p
Klinik SKB (mm Hg)	121,7±6,9	148,8±4,3	149,6±5,3	<0,001^a
Klinik DKB (mm Hg)	75,2±5,5	94,3±3,6	94,7±3,8	<0,001^b
24 saatlik SKB (mm Hg)*	119,8±8,7	118,1±8,8	145,2±4,4	<0,001
24 saatlik DKB (mm Hg)*	71,6±6,4	74,3±5,7	91,7±3,9	<0,001
Gün içi SKB (mm Hg)*	122,1±9,9	121,8±9,3	151,4±4,5	<0,001
Gün içi DKB (mm Hg)*	78±8,4	77±7,6	96,5±3,5	<0,001
Gece SKB (mm Hg) *	108,9±6,8	110,1±8,2	127,4±6,8	<0,001
Gece DKB (mm Hg) *	68,1±5,3	66,6±4,1	78,6±6,6	<0,001

^aBÖH ve kontrol, p<0,001, hipertansiyon ve kontrol, p<0,001; ^bBÖH ve kontrol, p<0,001, hipertansiyon ve kontrol, p<0,001.

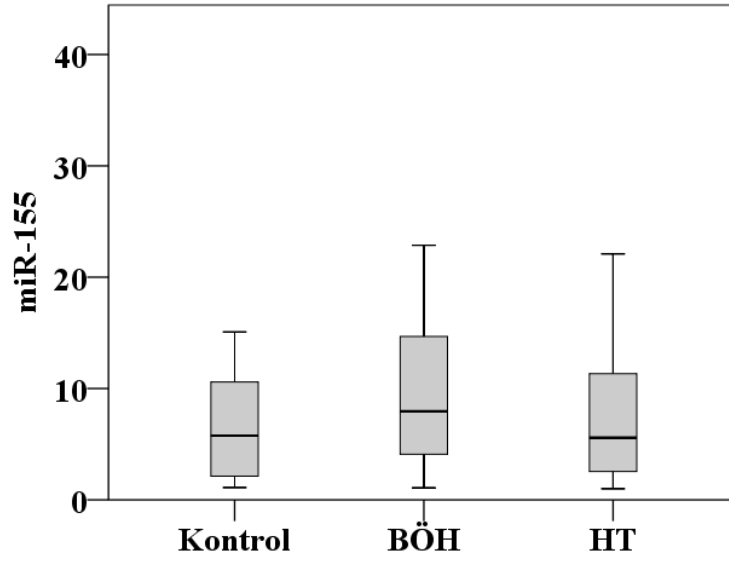
Gruplar, saptanan miR-125a ve miR-155 ekspresyon seviyeleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı (Tablo 4).

Tablo 4. Çalışma gruplarında miR-125a ve miR-155'in ekspresyon seviyeleri.

	Kontrol (n=30)	BÖH (n=30)	Hipertansiyon (n=30)	p
miR-125a	15,7±16,6	13,2±11,7	15,4±11,8	0,572
miR-155	8,5±8,9	10,2±8,2	8,4±8,4	0,284

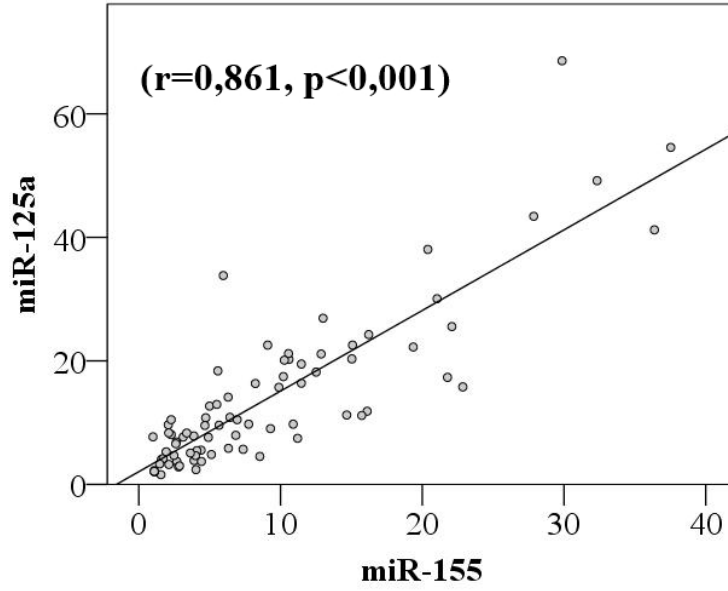


Şekil 1. Çalışma gruplarında miR-125a'nin ekspresyon seviyeleri.

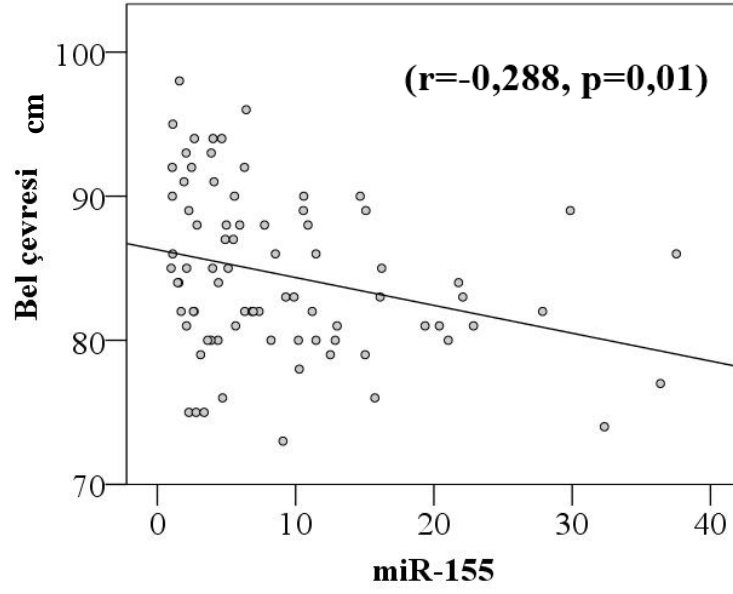


Şekil 2. Çalışma gruplarında miR-155'in ekspresyon seviyeleri.

Çalışılan tüm bireylerin miR-125a ile miR-155 ($r=0,861$, $p<0,001$) ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak aynı yönde ilişkili saptandı (Şekil 3). miR-125a seviyeleri ile klinik, kan basıncı ve laboratuvar ölçümleri arasında ilişki saptanmadı. miR-155 ile bel çevresi arasında anlamlı olarak ters yönde ilişki saptandı (Şekil 4). miR-155 ile diğer klinik, laboratuvar ve kan basıncı ölçümleri arasında ilişki görülmedi.



Şekil 3. Çalışmaya alınan tüm bireylerin miR-125a ile miR-155 düzeyleri arasındaki ilişki.



Şekil 4. Çalışmaya alınan tüm bireylerin bel çevresi (cm) ile miR-155 düzeyleri arasındaki ilişki.

Tartışma

Arteriyel hipertansiyon; miyokard infarktüsü, konjesif kalp yetersizliği, inme ve kardiyovasküler olaylarla ilgili morbidite ve mortalitenin önemli bir risk faktörüdür. Dünya çapında bir milyardan fazla erişkin primer veya esansiyel hipertansiyondan etkilenmektedir. Hipertansiyon önleme ve tedavi için mevcut stratejiler olayın patofizyolojisi ve nedenlerinin anlaşılmasında yetersiz kalmıştır. BÖH; tekrarlayan ofis ziyaretlerinde ofis kan basıncı ölçümlerinin yüksek olmasına rağmen, ev tansiyon ölçümlerinin normal olması veya ambulatuvar kan basıncı ölçümlerinin normal olduğu durumdur(17). BÖH'ün normotansifler ile hipertansifler arasında bir ara form olduğu ve hipertansiyonun öncülü olduğu bilinmektedir. Literatürde BÖH'ün normotansif kontrollere göre kardiyovasküler hastalık için artmış bir risk faktörü olduğu fakat bu riskin hipertansifler kadar olmadığı da iyi bilinmektedir(18, 19).

MikroRNAlar küçük, endojen ve kodlama yapmayan ≈21-23 bp uzunluğunda olan RNA molekülleridir. MikroRNA'lar mRNA'yı uyarmak veya post-transkripsiyonal olarak mRNA'yı inhibe ya da degrade ederek etkinliklerini göstermektedir. İnsan genomunun yaklaşık %60'ının ekspresyonunu regüle etmektedir. MikroRNA'lar diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve çeşitli kanserler gibi birçok hastalıkta tanı ve izlemede potent biyo-belirteçler olup, tedavi hedeflerinin belirlenmesi için yararlanılabilmektedir.

Hipertansif bozuklukların patogenezi anlayabilmek için hem normal hem artmış arter basıncının regülasyonuna ilişkin faktörlerin anlaşılması önemlidir. Kalp debisi ve periferik direnç, arter basıncının iki ana faktörüdür. Kalp debisi, atım hacmi ve kalp hızı ile hesaplanır. Kalp atım hacmi ise miyokardiyal kontraktilite ve vasküler damar

boyutu ile belirlenmektedir. Periferik direnç; küçük arterler (100-400 µm lümen çapı) ve arteriyolardaki işlevsel ve anatomik değişikliklerle belirlenir. Mekanizmaları şöyle özetleyebiliriz;

1- İnvasküler hacim: Uzun dönemde arter basıncının ana belirleyicisidir. Ekstravasküler sıvı, vasküler ve interstisyel alanlardan oluşur. Özellikle ekstrasellüler sıvı hacminde gelişen değişiklikler kan hacminde orantılı değişikliklere neden olur. Sodyum ekstrasellüler sıvı hacminin ana belirleyicisi olan baskın ekstrasellüler iyondur. NaCl alımı böbreğin sodyum atılım hızını aşarsa başta intravasküler hacim artar, kalp debisi yükselir. Ancak çoğu damar yatağı kan akımını kendi düzenler ve artmış kan basıncına karşın sabit akım sağlanabilmesi için vasküler yatağın direncini arttırması gerekir. Fakat zamanla periferik direnç artarak kalp debisini normale döndürür.

2- Otonom sinir sistemi: Otonom sinir sistemi kardiyovasküler hemostazı, basınç, hacim ve kemoreseptör sinyalleri ile sağlar. Adrenerjik refleksler kısa dönemde, adrenerjik fonksiyon, hormonal ve hacimle ilişkili faktörlerle birlikte kan basıncının uzun dönemde düzenlenmesine katkıda bulunur. Norepinefrin, epinefrin ve dopamin olarak kardiyovasküler düzenlemede önemli rolü olan üç adrenerjik katekolamin vardır. Çeşitli otonomik refleksler kan basıncını atımdan atıma etkiler. Arteriyel barorefleksi, karotis sinüslerinde ve aortik arkusta bulunan gerilme duyarlı duyuşal sinir sonlanmalarıdır. Bu baroreflekslerin uyarılma hızı, arteriyel basınçtaki yükselmelerle artar. Bunun sonucu sempatik çıkış azalır ve kan basıncı ile kalp hızı düşer. Bu durum postural değişikliklerde, davranışsal ve fizyolojik strese, kan hacmindeki değişikliklerde olduğu gibi arteriyel basınç değişikliklerinin akut düzenlenmesinde ana mekanizmadır. Ancak zaman içerisinde arteriyel basınçtaki sürekli yükselmelere barorefleksi duyarlılığı cevabı azalır veya buna adapte olur. Bu şekilde baroreseptörler daha yüksek basınçlara

uyumlu hale gelir. Otonom nöropati ve bozuk baroreflaks işlevselliği olan hastalarda, aralıklı kan basıncı pikleri ile gelen aşırı derecede labil kan basınçları gözlenebilir.

3- Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS): RAAS arter basıncı üzerine etkisini ön planda anjiyotensin II' nin vasokonstriktör özellikleri ve aldosteronun tuz tutucu özellikleri ile sağlar. Renin enzimatik olarak inaktif öncülü proreninden sentezlenen bir aspartil proteazdır. Dolaşımdaki reninin çoğu, jukstaglomerüler hücreler ve henle kulpunun distal ucunda yerleşmiş bir grup duyusal hücrelerde (makula densa) sentezlenir. Prorenin dolaşıma doğrudan salıverilebilir veya sekretuar hücrelerde aktive edilerek aktif renin şeklinde salınabilir. Renin sekresyonu için üç ana uyarıcı; henle kulpunun çıkan kalın kolunda azalmış NaCl transportu (makula densa mekanizması), renal afferent arteriyolde azalmış basınç veya gerilim (baroreseptör mekanizması) ve β_1 adenoreseptörler vasıtasıyla renin salgılayan hücrelerin sempatik sinir sisteminde uyarılması'dır. Renin sekresyonunda azalma ise henle kulpunun çıkan kalın kolunda artan NaCl transportu, renal afferent arteriyolda artmış gerilim ve β_1 blokajıyla olur. Ayrıca renin sekresyonu anjiyotensin II'nin de dahil olduğu bir dizi hormonal faktörlerle de düzenlenir. Anjiyotensin II'nin Anjiyotensin II reseptör tip 1 (AT1) ve tip 2 (AT2) olmak üzere iki tip reseptörü vardır. Etkilerinin çoğu AT1 üzerinden olur. Anjiyotensin II'nin AT1 reseptörüne bağlanmasıyla periferik damarlarda vazokonstriksiyon, aldosteron sentez ve salınımı, renal tübüler sodyum geriabsorpsiyonu, santral sinir sisteminin aktivasyonu ve vasopressin salınımı uyarılır. Anjiyotensin II; hücre zarında bulunan AT1 üzerinde etki eden önemli bir pressör maddedir. Anjiyotensin II, renin sekresyonunu jukstaglomerüler hücreler üzerindeki AT1 aracılığıyla doğrudan inhibe eder. Anjiyotensin dönüştürücü enzim veya anjiyotensin II reseptörlerinin farmakolojik blokajına yanıt olarak renin sekresyonu artar. Ayrıca

Anjiyotensin II, adrenal zona glomerülozadan aldosteron sekresyonunda primer uyarıcı olup vasküler düz kas bölünmesinde de etkili güçlü bir mitojendir. Hemodinamik etkilerinden bağımsız olarak anjiyotensin II, damar duvarında doğrudan hücrelerel etkilerle de atheroskleroz sürecinde rol sahibi olabileceği düşünülmektedir. AT2 böbrekte yaygın olarak bulunur ve AT1'e zıt etkilere sahiptir. Bazı çalışmalarda RAAS mekanizması ve HT arasındaki ilişki üzerine miR-155, miR-526b, miR-578, miR-34a ve miR-124'ün etkili olabileceği gösterilmiştir(20).

4- Vasküler mekanizmalar: Arterlerdeki direnç gelişiminde etkili damar çap ve kompliyansı arteriyel basıncı etkileyen önemli etkenlerdendir. Arteriyel akıma karşın gelişen direnç, arteriyel çapın dördüncü kuvveti ile ters orantılı olarak değişir. Sonuç olarak damar çapındaki küçük değişiklikler dirençte belirgin artışa yol açar. Hipertansif hastalarda yapısal, mekanik ya da fonksiyonel değişiklikler küçük arter ve arteriyollerin çapını değiştirebilir. Remodelling (yeniden düzenlenme) damar hacminde değişiklik olmaksızın damar duvarında geometrik değişikliklerin olduğu durumu ifade eder. Artmış hücre sayısı, artmış hücre boyutu ve intrasellüler matriksin artmış deposyonu ile oluşan remodelling sonucu vasküler lümen çapı azalır ve artmış periferik dirence katkıda bulunur. Apoptoz, düşük düzeyde inflamasyon ve vasküler fibrozis de remodellinge katkıda bulunur. Lümen çapı aynı zamanda damarın esnekliği ile de ilişkilidir. Yüksek derecede esnek olan damarlar artmış volüme fazla basınç değişikliği olmadan uyum sağlarken, yarı sertleşmiş damarlarda ise damar hacmindeki küçük artışlar basınçta büyük artışlara sebep olur. Vasküler mekanizmalardaki değişimlerin HT etyopatogenezindeki rolü ile ilişkili birtakım miRNA'larla (miR-143, miR-21, miR-221 ve miR-222) yapılmış çalışmalar da mevcuttur(14, 20).

5- Endotel disfonksiyonu: Endotel hücreleri, damar duvarındaki düz kas hücreleri üzerinde vazoaaktif dilatasyon ve konstrüksiyon yapan birçok madde salgılayarak hipertansiyon patogenezinde aktif rol alır. Bunların içinde en güçlüleri nitrik oksit (NO) ve endotelindir. NO kısa etki süreli, yüksek penetrasyon özelliği olan bir gazdır. Çok güçlü bir vazodilatatör olup trombosit adezyon ve agregasyonunu inhibe edici, damar düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü engelleyici etkileri de vardır (21). Kan basıncı değişiklikleri, damar duvarındaki gerilim ve akıma bağlı mekanik değişiklikler gibi birçok uyarana yanıt olarak endotel hücrelerinden salgılanır. Böylece bölgesel ve sistemik kan akımı ve kan basıncı regülasyonunda rol alır. Vazokonstriktör hormonlara yanıt olarak salgılanan güçlü bir vazodilatör maddedir ve normal kan basıncının sürdürülmesini sağlar(22). NO, kan basıncını organların perfüzyonunu, onlara zarar vermeden sınırla tutarak sağlayan dengeleyici bir maddedir. NO, insülin direnci olan kişilerde hipertansiyonun ortaya çıkmasında önemli rol oynar. Normotansif bireylerle karşılaştırıldığında çoğu hipertansif hastada sistemik arteriyel tonus artışı ile ilişkili bulunmuştur(23). Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki; NO kan basıncının düzenlenmesine katkıda bulunmakta ve bozulmuş NO aktivitesi ile hipertansiyon arasında ilişki bilinmektedir. Ancak bu ilişkinin etiyolojisi ve mekanizması çok iyi bilinmemekte olup bozulmuş NO aktivitesinin hipertansiyondan önce mi geliştiği yoksa hipertansiyonun seyri sırasında mı geliştiği hala net değildir(24). NO'in kan basıncını düzenleyici rolünü destekler biçimde, hayvanlara NO sentezini inhibe eden ilaçlar verildiğinde, hipertansiyonun ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu da kardiyovasküler sistemin kan akımı ve kan basıncı regülasyonunun sürekli NO bağımlı vazodilatör etkiyle çalıştığını düşündürmektedir. NO seviyeleri çeşitli çalışmalarda hipertansif hastalarda yüksek(25), etkilenmemiş(26), düşük(27-30) olarak bildirilmiştir. Bu çelişkili sonuçlar nitrik oksid sentaz (NOS) polimorfizmi gibi genetik varyasyonlar nedeniyle

NO sentezini ve işlevini etkiliyor olabilir. Ayrıca NO sentezi diyet, böbrek fonksiyonları ve hidrasyon durumu gibi birçok faktörden de etkileniyor olabilir(24). Endotelin ise endotel hücrelerinden salgılanan ve düz kas hücrelerine endotelin reseptör A (ETA) üzerinden etki ederek vazokonstriksiyona neden olan bir peptiddir(31). Bunun yanında, endotelin reseptör B (ETB) reseptörüne bağlanarak prostasiklin ve NO üretimi yoluyla vazodilatasyon da yapabilir. Ciddi hipertansiyon oluşturulan hayvan modellerinde küçük damarların endotelinde endotelin üretiminin artmış bulunması, hipertansiyon patogenezinde endotelinin rolünü desteklemektedir. Endotelin üretimindeki artış, kan basıncı yükselmesinin yanında hipertansif kişilerde küçük damarlarda hipertrofik yeniden şekillenmenin oluşumundan da sorumlu tutulmaktadır. Kombine ETA ve ETB reseptör blokleri olan Bosentan'ın esansiyel hipertansiyonlu hastalarda kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir(32). Bu da endotelinin kan basıncı yükselmesindeki rolünü gösteren önemli bir kanıttır. Çalışmamızda baktığımız miR-125a ile bazı diğer miRNA'ların (miR-126, miR-217, miR-24 ve miR-130a) HT etyopatogenezinde rol aldığı çalışmalarla gösterilmiştir(20).

Multifaktöryal bir hastalık olan hipertansiyon gelişimi üzerine etkili olan bu mekanizmalar ile ilişkili olduğu bilinen birçok mikroRNA'dan özellikle endotel disfonksiyonu ve RAAS yolunda etkili miR-125a ve miR-155 gen ekspresyon seviyelerini araştırdık. Çalışmamızda HT ve BÖH hastaları ile sağlıklı bireylerin plazma miR-125a ve miR-155 ekspresyon düzeylerini ölçerek, bu düzeylerle klinik ve laboratuvar sonuçları arasındaki ilişkiyi araştırdık.

MiR-125a damar endotel hücrelerinden endotelin-1 ekspresyonunu inhibe etmektedir. Li ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı bir çalışmada, hipertansiyonu olan sıçanlarda miR-125a ekspresyonunun azaldığı ve endotelin-1 ekspresyonuyla ters

ilişkili olduğunu göstermiştir(14). Pulmoner hipertansiyon üzerine yapılan bir çalışmada hipoksik pulmoner hipertansiyonlu sıçanların akciğer dokusunda hipoksik olmayan sıçanlardakilere kıyasla miR-125a ekspresyon seviyelerinin daha yüksek olduğu bulunmuş. Fakat dolaşımdaki serum miR-125a ekspresyon seviyeleri pulmoner hipertansiyonu olan gruptaki sıçanlarda daha düşük bulunmuş. MiR-125a'nın pulmoner hipertansiyon etiyo-patogenezinde önemli bir rolünün olabileceği ve gelecekte pulmoner hipertansiyon tedavisinde alternatif bir hedef olabileceği vurgulanmıştır(33). Bizim çalışmamızda miR-125a ekspresyon seviyeleri en yüksek kontrol grubunda olmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

MiR-155 endotelial Nitrik Oksid Sentaz (eNOS) enzimini regüle ederek ve tip-1 anjiyotensin II reseptörünü baskılayarak hipertansiyon gelişimine etki etmektedir(15, 34). Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miR-155, 3'-UTR'ye (3' untranslated regions) bağlanarak eNOS-mRNA stabilitesini azaltıp eNOS seviyelerini baskıladığını göstermişlerdir. MiR-155 eNOS seviyelerini doza bağımlı olarak azalttığını ve eNOS proteini miR-155'in direkt bir hedefi olduğunu düşünmüşlerdir. Ayrıca mutant bir miR-155 ile de eNOS seviyelerinin baskılanmadığı gözlemlenmiştir(15). Diğer bir çalışmada ise insan umbilikal ven endotel hücrelerinde çalışılmış ve artmış miR-155 ekspresyon seviyeleri ile eNOS seviyeleri ve aktivitelerinin azaldığı, buna ilaveten TNF- α tedavisi ile miR-155 ekspresyon seviyelerinin arttığı ve bununla uyumlu olarak eNOS seviyelerinin baskılandığı gözlemlenmiştir. Keza anti-miR-155 kullanılarak TNF- α ile baskılanan eNOS seviyelerinin tekrar arttığı görülmüştür(34). Bizim çalışmamızda miR-155 ekspresyon düzeyleri hipertansiyon grubunda en düşük saptanmasına karşın, tüm gruplar arasında miR-155 ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel anlamlılık saptanmadı. MiR-125a ile miR-155 arasında ileri derecede

anlamli aynı yönde bir ilişki görüldü. MiR-155'in bel çevresi ölçümü ile de ters yönde anlamli bir ilişkinin olması metabolik sendromun önemli bir komponenti olan hipertansiyon ile ilişkili olabileceğini desteklemektedir.

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, çeşitli mikroRNA ekspresyon düzeyleri ile klinik ve ambulatuvar kan basıncı ölçümleri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Kontaraki ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 24 saatlik ambulatuvar diyastolik kan basıncı ölçümleri ile miR- 143, miR-145, miR-21 ve miR-133 düzeyleri arasında anlamli ilişki gösterilmiştir[38]. Diğer bir çalışmada ise 24 saatlik ambulatuvar sistolik ve diyastolik kan basıncı ölçümü ile miR-296-5p ekspresyon seviyeleri arasında anlamli olarak ters yönde ilişki olduğu görülmüştür(35). miR-125a ve miR-155 ile yapılan çalışmalarda ambulatuvar ve klinik kan basıncı ölçümleri arasında bir ilişki görülmemiştir(36, 37). Bizim çalışmamızda miR-125a ve miR-155 ekspresyon seviyeleri ile klinik ve ambulatuvar kan basıncı ölçümleri arasında bir ilişki görülmedi(38).

Çalışmamızda maliyet etkinliği çok yüksek olduğundan insan genomundaki tüm mikroRNA'ları taramak yerine literatürde hipertansiyon ile ilişkisi en çok bilinen mikroRNA'lardan miR-155 ile miR-125a ekspresyon seviyelerini araştırabildik. Yine yüksek maliyet etkinliği nedeniyle miR-125a ve miR-155 ekspresyon düzeyleri ile endotel disfonksiyonu ile olan ilişkilerini belirlemede hedef moleküller olan endotelin-1 ve eNOS düzeylerine bakamadık. Dolayısıyla çalıştığımız plazma mikroRNA ekspresyon düzeylerini sadece tanısal bir gösterge olarak araştırabildik. Mikro-array veya RNA sekanslamayla tüm mikroRNA profili ortaya çıkarılırsa hipertansiyon ve BÖH için yeni aday belirteçler belirlenmesine ve güncel belirteçlerin doğrulanmasına daha yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışma grubularımızdaki vaka sayısını

güç analizi sonrası belirlememize rağmen grupların nisbi olarak küçük olmasından dolayı, hipertansiyon ve BÖH'ün altta yatan mekanizmalarının tam anlaşılması için daha ileri in vitro ve in vivo çalışmalar gerektirmektedir. MikroRNA'ların arter kan basıncındaki pato-fizyolojik potansiyellerini ve de endotelial disfonksiyon, atheroskleroz ve uç organ hasarı ile ilişkisini açıklayabilmek için daha kapsamlı ve ileri işlevsel çalışmalarla aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda hipertansiyon ve BÖH'ün etiyopatogenezini epigenetik yönden araştırdık ve çıkan sonuçlar literatür verileri ile uyumluydu. Ancak vaka sayısının az olması nedeni ile anlamlı bir ilişki gösteremedik. Hipertansiyon ve BÖH hastalarının mikroRNA ekspresyon düzeylerinin tutarlı olduğu ve aynı yönde değişim gösterdiği görülmüştür. Bu sonuçlar hipertansiyon ve BÖH'ü anlamamıza yönelik miRNAların önemli etkileri olabileceğini öne sürmektedir. Gelecekte hipertansiyon ve BÖH'lü hastaların tanı, tedavi ve takibinde mikroRNA'lar önemli katkılar sağlayabilir ve klinik kullanıma girebilir. Teknolojinin gelişimi ile yeni nesil sekanslama yöntemleri, genetik ve epigenetik ile hipertansiyon ve BÖH arasında daha fazla ilişki kurulabilir.

Kaynaklar

1. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Whelton PK, He J. Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *J Hypertens.* 2004;22(1):11-9.
2. Nadar SK, Tayebjee MH, Messerli F, Lip GY. Target organ damage in hypertension: pathophysiology and implications for drug therapy. *Curr Pharm Des.* 2006;12(13):1581-92.
3. Pickering TG, James GD, Boddie C, Harshfield GA, Blank S, Laragh JH. How common is white coat hypertension? *JAMA.* 1988;259(2):225-8.
4. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2013;31(7):1281-357.
5. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA.* 2014;311(5):507-20.
6. Mancia G, Bombelli M, Facchetti R, Madotto F, Quarti-Trevano F, Grassi G, et al. Increased long-term risk of new-onset diabetes mellitus in white-coat and masked hypertension. *J Hypertens.* 2009;27(8):1672-8.
7. Karter Y, Curgunlu A, Altinisik S, Erturk N, Vehid S, Mihmanli I, et al. Target organ damage and changes in arterial compliance in white coat hypertension. Is white coat innocent? *Blood Press.* 2003;12(5-6):307-13.

8. Puato M, Palatini P, Zanardo M, Dorigatti F, Tirrito C, Rattazzi M, et al. Increase in carotid intima-media thickness in grade I hypertensive subjects: white-coat versus sustained hypertension. *Hypertension*. 2008;51(5):1300-5.
9. Ugajin T, Hozawa A, Ohkubo T, Asayama K, Kikuya M, Obara T, et al. White-coat hypertension as a risk factor for the development of home hypertension: the Ohasama study. *Arch Intern Med*. 2005;165(13):1541-6.
10. Pierdomenico SD, Cuccurullo F. Prognostic value of white-coat and masked hypertension diagnosed by ambulatory monitoring in initially untreated subjects: an updated meta analysis. *Am J Hypertens*. 2011;24(1):52-8.
11. Pierdomenico SD, Lapenna D, Di Mascio R, Cuccurullo F. Short- and long-term risk of cardiovascular events in white-coat hypertension. *Journal of human hypertension*. 2008;22(6):408-14.
12. Yu LP, Shi LY, Zhang MM, Wang SY, Cai J, Gao MM, et al. [MicroRNA expression profile and pathogenetic initial study in essential hypertension]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2011;39(6):488-93.
13. O'Brien E, Coats A, Owens P, Petrie J, Padfield PL, Littler WA, et al. Use and interpretation of ambulatory blood pressure monitoring: recommendations of the British hypertension society. *BMJ*. 2000;320(7242):1128-34.
14. Li D, Yang P, Xiong Q, Song X, Yang X, Liu L, et al. MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells. *J Hypertens*. 2010;28(8):1646-54.
15. Sun HX, Zeng DY, Li RT, Pang RP, Yang H, Hu YL, et al. Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*. 2012;60(6):1407-14.

16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
17. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood Press*. 2014;23(1):3-16.
18. Yavuzer S, Yavuzer H, Cengiz M, Erman H, Altiparmak MR, Korkmazer B, et al. Endothelial damage in white coat hypertension: role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein-1. *J Hum Hypertens*. 2015;29(2):92-8.
19. Sung SH, Cheng HM, Wang KL, Yu WC, Chuang SY, Ting CT, et al. White coat hypertension is more risky than prehypertension: important role of arterial wave reflections. *Hypertension*. 2013;61(6):1346-53.
20. Batkai S, Thum T. MicroRNAs in hypertension: mechanisms and therapeutic targets. *Curr Hypertens Rep*. 2012;14(1):79-87.
21. Nava E, Luscher TF. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J Hypertens Suppl*. 1995;13(2):S39-48.
22. Higashi Y, Oshima T, Ozono R, Matsuura H, Kambe M, Kajiyama G. Effect of L-arginine infusion on systemic and renal hemodynamics in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 1999;12(1 Pt 1):8-15.
23. Hermann M, Flammer A, Luscher TF. Nitric oxide in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006;8(12 Suppl 4):17-29.
24. Dominiczak AF, Bohr DF. Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension*. 1995;25(6):1202-11.

25. Zavaroni I, Ardigo D, Rossi PC, Zuccarelli A, Pacetti E, Monti L, et al. Relationship between plasma nitric oxide concentration and insulin resistance in essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2004;17(7):549-52.
26. Cittadino M, Goncalves de Sousa M, Ugar-Toledo JC, Rocha JC, Tanus-Santos JE, Moreno H, Jr. Biochemical endothelial markers and cardiovascular remodeling in refractory arterial hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2003;25(1):25-33.
27. Armas-Padilla MC, Armas-Hernandez MJ, Sosa-Canache B, Cammarata R, Pacheco B, Guerrero J, et al. Nitric oxide and malondialdehyde in human hypertension. *Am J Ther*. 2007;14(2):172-6.
28. Kedziora-Kornatowska K, Kornatowski T, Bartosz G, Pawluk H, Czuczejko J, Kedziora J, et al. Production of nitric oxide, lipid peroxidation and oxidase activity of ceruloplasmin in blood of elderly patients with primary hypertension. Effects of perindopril treatment. *Aging Clin Exp Res*. 2006;18(1):1-6.
29. Tillman K. Relationship between physical fitness and selected personality traits. *Res Q*. 1965;36(4):483-9.
30. Curgunlu A, Uzun H, Bavunoglu I, Karter Y, Genc H, Vehid S. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in white coat hypertension. *J Hum Hypertens*. 2005;19(8):629-33.
31. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med*. 1995;333(6):356-63.
32. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338(12):784-90.

33. Huber LC, Ulrich S, Leuenberger C, Gassmann M, Vogel J, von Blotzheim LG, et al. microRNA-125a in pulmonary hypertension: Regulator of a proliferative phenotype of endothelial cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2015.
34. Martin MM, Lee EJ, Buckenberger JA, Schmittgen TD, Elton TS. MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2006;281(27):18277-84.
35. Cengiz M, Yavuzer S, Kilickiran Avci B, Yuruyen M, Yavuzer H, Dikici SA, et al. Circulating miR-21 and eNOS in subclinical atherosclerosis in patients with hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2015:1-7.
36. Rink C, Khanna S. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology. *Physiol Genomics*. 2011;43(10):521-8.
37. Xu CC, Han WQ, Xiao B, Li NN, Zhu DL, Gao PJ. [Differential expression of microRNAs in the aorta of spontaneously hypertensive rats]. *Sheng Li Xue Bao*. 2008;60(4):553-60.
38. Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, Parthenakis FI, Vardas PE. Differential expression of vascular smooth muscle-modulating microRNAs in human peripheral blood mononuclear cells: novel targets in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2014;28(8):510-6.