



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DÜŞÜK EJEKSİYON FRAKSİYONLU KALP YETMEZLİĞİ (LVEF<%40) OLAN
DİYABETİK HASTALARDA SGLT-2 İNHİBİTÖRÜ İLAÇLARIN EPİGENETİK
ETKİSİ**

Doç. Dr. İrfan Veysel DÜZEN

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr.Üyesi Gülper NACARKAHYA

GAZİANTEP

2023

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DÜŞÜK EJEKSİYON FRAKSİYONLU KALP YETMEZLİĞİ (LVEF<%40) OLAN
DİYABETİK HASTALARDA SGLT-2 İNHİBİTÖRÜ İLAÇLARIN EPİGENETİK
ETKİSİ**

Doç. Dr. İrfan Veysel DÜZEN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Gülper NACARKAHYA

GAZİANTEP

2023

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DÜŞÜK EJEKSİYON FRAKSİYONLU KALP YETMEZLİĞİ (LVEF<%40) OLAN
DİYABETİK HASTALARDA SGLT-2 İNHİBİTÖRÜ İLAÇLARIN EPİGENETİK
ETKİSİ**

İrfan Veysel DÜZEN

Tez Savunma Tarihi: 18.09.2023

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Davut Sinan KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Sibel Oğuzkan BALCI
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Gülper NACARKAHYA
İkinci Danışman

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Doç. Dr. Şenay Görücü Yılmaz

Doç. Dr. Necla Benlier

Dr. Öğr. Üyesi Abu Shamem Daadat Khandakar

Dr. Öğr. Üyesi Murat Korkmaz

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tarih

(İmza)

Doç. Dr. İrfan Veysel DÜZEN

ÖNSÖZ

Doktora sürecim boyunca her konuda bana yardımcı olan, yoğun klinik tempoma rağmen doktora ve tezimi bitirmem konusunda beni hep olumlu yönde motive eden tez hocam Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI'ya teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam süresince katkı ve yardımlarını esirgemeyen hocalarımız Doç. Dr. Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ'a, Dr. Öğr. Üyesi Gülper NACARKAHYA'ya, Dr. Öğr. Üyesi Shameem SAADAT'a ayrıyeten teşekkür ediyorum.

Her zaman yanımda olan eşim Betül DÜZEN'e, her türlü bilimsel çalışmada fikir ve destek gördüğüm ablam Suzan TABUR'a ve Elif OĞUZ'a teşekkürü borç bilirim.

Doç. Dr. İrfan Veysel DÜZEN

Gaziantep 2023

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	v
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	x
2. GENEL BİLGİLER	1
2.1. Kalp Yetmezliği Tanısı ve Epidemiyolojisi.....	1
2.2. Kalp Yetmezliği Patofizyolojisi.....	1
2.3. Düşük Ejeksiyon Fraksiyonlu Kalp Yetmezliği Tedavisi ve prognoz.....	2
2.4. SGLT-2 İnhibitörleri.....	3
2.5. Mikro RNA’lar	5
2.5.1. miRNA.....	5
2.5.2. miRNA Biogenez.....	7
2.5.3. miRNA fonksiyonları ve kardiyovasküler hastalıklardaki yeri.....	8
2.5.4. Çalışmamızda kullanılan miRNA’lar ve Kalp yetmezliğindeki yerleri.....	8
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	12
3.1. Hasta Seçimi	12
3.1.1. Hastaların çalışmaya dahil olma kriterleri	12
3.1.2. Hastaların çalışmadan dışlanma kriterleri.....	13
3.1.3. Kan Örneklerinin Toplanması ve Çalışılması.....	13
3.2. İstatistik Analiz Yöntemleri	15
3.2.1. miRNA Seviyelerinin İstatistiksel Analizi	16
4. BULGULAR	17
4.1. miR-21’in gruplar arası kıyaslaması.....	17
4.2. miR-499’un gruplar arası kıyaslaması	19
4.3. miR-132’nin gruplar arası kıyaslaması	21

4.4. miR-210'un gruplar arası kıyaslaması	23
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	26
6. KAYNAKLAR	31



ÖZET

DÜŞÜK EJEKSİYON FRAKSİYONLU KALP YETMEZLİĞİ (LVEF<%40) OLAN DİYABETİK HASTALARDA SGLT-2 İNHİBİTÖRÜ İLAÇLARIN EPIGENETİK ETKİSİ

İrfan Veysel DÜZEN

Doktora Tezi, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanları: Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI, Dr. Öğr.Üyesi Gülper
NACARKAHYA

Gaziantep, 2023

56 Sayfa

Kalp yetmezliği tüm dünyada mortalite ve morbiditenin en önemli sebeplerinden biri olmaya devam etmektedir. Son zamanlarda kalp yetmezliği tedavisinde mortalite üzerine direk etkisi nedeniyle kılavuzlarda kullanılması gereken ilaçlar listesine giren SGLT-2 inhibitörü ilaçların etki mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada SGLT-2 kullanımı ile kalp yetmezliği hastalarında bazı mikro RNA'ların (miRNA) seviyelerinde değişim olup olmadığına bakılarak bu grup ilacın olası epigenetik etkisi araştırılmıştır.

Üniversitemiz kardiyoloji kliniğinde ejeksiyon fraksiyonu %40'ın altında olduğu tespit edilen ve endokrinoloji tarafından SGLT-2 inhibitörü kullanımı uygun görülen 40 hasta ve 20 sağlıklı gönüllü hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların kan örneklerinden SGLT-2 inhibitörü ilaç kullanımı öncesi ve SGLT-2 inhibitörü ilaç kullanımını takiben üçüncü ayda Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile miR-21, miR-132, miR-499 ve miR-210 gen ekspresyon düzeyleri analiz edildi. Yine sağlıklı gönüllülerden alınan kan örneklerinden aynı şekilde miR-21, miR-132, miR-499 ve miR-210 gen ekspresyon düzeylerine bakıldı.

İlaç kullanımı sonrası üçüncü ayda miR-21 ve miR-499 gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı biçimde artış olduğu saptandı ($p=0,005$) miR-210 ekspresyon düzeyinde hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmakla beraber ilaç kullanımı sonrası değişiklik olmadığı bulundu. miR-132 ekspresyon düzeyinde açısından ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ($p=0,421$).

Sonuç olarak SGLT-2 inhibitörü ilaçların etki mekanizmalarından biri de epigenetik olarak miRNA seviyelerini değiştirerek (miR-21, miR-499) olabilir.

Anahtar Kelimeler: miRNA, kalp yetmezliği, SGLT-2

ABSTRACT

DÜŞÜK EJEKSİYON FRAKSİYONLU KALP YETMEZLİĞİ (LVEF<%40) OLAN DİYABETİK HASTALARDA SGLT-2 İNHİBİTÖRÜ İLAÇLARIN EPIGENETİK ETKİSİ

İrfan Veysel DÜZEN

Doktora Tezi, TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanları: Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI, Dr. Öğr. Üyesi Gülper
NACARCAHYA**

Gaziantep, 2023

56 Sayfa

Heart failure continues to be one of the most important causes of mortality and morbidity worldwide. The mechanism of action of SGLT-2 inhibitor drugs, which have recently been included in the list of drugs that should be used in the guidelines due to their direct effect on mortality in the treatment of heart failure, is still not fully known. In this study, we investigated the possible epigenetic effect of this group of drugs by looking for changes in the levels of some microRNAs in heart failure patients with SGLT-2 use.

Forty patients with an ejection fraction of less than 40% in the cardiology clinic of our university and deemed suitable for SGLT-2 inhibitor use by endocrinology and 20 healthy volunteers were included in the study. The levels of miRNA-21, miRNA-132, miRNA-499 and miRNA-210 were analysed by Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in blood samples obtained from healthy volunteers before and 3 months after drug use.

There was a statistically significant increase in miR-21 and miR-499 gene expression levels in the third month after drug use ($p=0.005$). Although there was a statistically significant increase in miR-210 expression level in patients, there was no change after drug use. In terms of miR-132 expression level, there was no statistically significant difference between the groups ($p = 0.421$).

In conclusion, one of the mechanisms of action of SGLT-2 inhibitor drugs may be by epigenetically changing miRNA levels (miR-21, miR-499).

Keywords: miRNA, heart failure, SGLT-2,

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

SGLT-2	:Sodyum Glukoz Transporter-2
miRNA	: Mikro RNA
EF	: Ejeksiyon Fraksiyonu
HfrEf	: Düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği
HfPEf	: Korunmuş ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği
KY	: Kalp yetmezliği
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	:Deoksiribonükleik Asid
RNA	:Ribonükleik Asid

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. cDNA reaksiyonu için gerekli bileşenler	14
Tablo 3.2. qPCR reaksiyonu için gerekli bileşenler	15
Tablo 3.3. Döngü parametreleriyle Gerçek Zamanlı PCR amplifikasyonu.....	15
Tablo 4.1. Hastaların ve sağlıklı gönüllülerin demografik özellikleri	17
Tablo 4.2. Kalp yetmezliği hastalarının SGLT-2 inhibitörü kullanımı öncesi kullandığı ilaçlar	17
Tablo 4.3. miR-21 düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	19
.Tablo 4.4. miR-499 düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	20
Tablo 4.5. miR-132 düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	21
Tablo 4.6. miR-210 düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	23

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. miRNA biyogenezi (Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Value of Circulating miRNAs in Heart Failure Patients Associated with Oxidative Stress Oxid Med Cell Longev 2016;2016:5893064’dan alınmıştır)	11
Şekil 4.1. miR-21’in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların SGLT-2 kullanımı öncesi ve SGLT-2 kullanım sonrası 3. ay karşılaştırılması.....	18
Şekil 4.2. miR-21’in $22^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre SGLT-2 kullanımı sonrası ve öncesi hasta grubunun kendi içinde karşılaştırılması.....	18
Şekil 4.3. miR-21’in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların ilaç kullanımı öncesi bazal değerlerinin karşılaştırılması,.....	19
Şekil 4.4. miR-499’un $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların SGLT-2 kullanımı öncesi ve SGLT-2 kullanım sonrası 3. ay karşılaştırılması.....	20
Şekil 4.5. miR-499’in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre SGLT-2 kullanımı sonrası ve öncesi hasta grubunun kendi içinde karşılaştırılması.....	20
Şekil 4.6. miR-499’un $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların ilaç kullanımı öncesi bazal değerlerinin karşılaştırılması.....	21
Şekil 4.7. miR-132’nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların SGLT-2 kullanımı öncesi ve SGLT-2 kullanım sonrası 3. ay karşılaştırılması.....	22
Şekil 4.8. miR-132’nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre SGLT-2 kullanımı sonrası ve öncesi hasta grubunun kendi içinde karşılaştırılması.....	22
Şekil 4.9. miR-132’nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların ilaç kullanımı öncesi bazal değerlerinin karşılaştırılması.....	23

Şekil 4.10. miR-210'un $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların SGLT-2 kullanımı öncesi ve SGLT-2 kullanım sonrası 3. ay karşılaştırılması.....	24
Şekil 4.11. miR-210'un $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre SGLT-2 kullanımı sonrası ve öncesi hasta grubunun kendi içinde karşılaştırılması.....	24
Şekil 4.12. miR-210'un $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların ilaç kullanımı öncesi bazal değerlerinin karşılaştırılması.....	25



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kalp yetersizliği, semptomatik sol ventrikül (LV) işlev bozukluğuna yol açan fonksiyonel veya yapısal bozukluklardan kaynaklanan karmaşık bir klinik sendromdur. Nüfusun giderek yaşlanması sonucu dünya genelinde artış göstermekte olup yakın zamanda ülkemizde yapılan HAPPY (Heart Failure Prevalence and Predictors in Turkey) çalışması verilerine göre ülkemizde 2 milyonun üzerinde kalp yetersizliği hastası bulunmaktadır (1,2,3). Doğal seyrine bırakıldığında KY(kalp yetmezliği) hastalarının yaşam beklentisi birçok kanserden daha düşüktür. Kalp yetersizliği hastalarında tedavi ve sağ kalımı arttırmaya yönelik müdahalelerdeki yeniliklere rağmen hastaların yaklaşık %20'sinde orta-ileri derecede şikayetler devam etmekte ve bu grup hastada yıllık ölüm oranı %50'ye kadar çıkabilmektedir. Bu nedenle bu hasta grubundaki hastaların tedavisinin bireyselleştirilmesi kritik öneme sahiptir.

Düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetersizliği olan hastalar için, modern tedavi, büyük randomize kontrollü çalışmalarda mortaliteyi ve hastaneye yatış oranlarını azalttığı kanıtlanmış çoklu ilaç tedavilerini içerir. Klinik çalışmalarda bu tıbbi tedavilerin sağkalımı arttırdığı rutin klinik pratikte gösterilmiştir.

Diyabetik hastaların tedavisinde kullanılan SGLT-2 inhibitörü moleküllerin Düşük Ejeksiyon Fraksiyonlu Kalp Yetmezliği (HFrEF) olan hastalardaki mortalite ve morbidite üzerine azaltıcı etkisi tesadüfen saptanmış olup; bu gruptaki ilaçlar randomize kontrollü çalışmalarla güncel kılavuzlarda düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği olan diyabetik ve diyabetik olmayan hastalarda hastane yatışlarını ve mortaliteyi azaltması nedeniyle yüksek kanıt düzeyiyle önerilmektedir (4). Ancak bu olumlu etkilerin mekanizması hala tam olarak olarak açıklanmış olmayıp bu konudaki araştırmalar devam etmektedir.

MiRNA'lar küçük kodlayıcı olmayan RNA'ların bir sınıfıdır. MikroRNA'lar posttranskripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde aktif rol oynarlar. Şaşırtıcı bir şekilde, kalp dokusunda en fazla eksprese edilen miRNA'ların düzeyi kardiyovasküler hastalıklar sırasında ciddi oranda değişebilmektedir. Bu da mikroRnaların kardiyovasküler hastalıklar esnasında gen ekspresyonu üzerinde önemli etkisi olduğunu düşündürmektedir

Bu çalışmanın amacı SGLT-2 (Sodyum glukoz transporter-2) inhibitörü ilaçların olası etki mekanizmalarından birinin epigenetik olup olmadığı sorusudur. Bu çalışmada SGLT-2 inhiibitörü kullanmayan düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezlikli hastalarda SGLT-2 inhibitörü kullanımını takiben 3. ayın sonunda bazal ve 3. ay serumlarında kalp yetmezliği ile ilgili olan 4 adet miRNA geni ekspresyon düzeyleri (miR-21, miR-132, miR-210, miR-499) analiz edilerek SGLT-2 inhiibitörünün kalp yetmezliğindeki olası epigenetik etkilerinin araştırılması amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalp Yetmezliği Tanısı ve Epidemiyolojisi

Kalp yetmezliği (HF), yüksek natriüretik peptid seviyeleri ve/veya pulmoner veya sistemik konjesyonun objektif göstergeleri tarafından desteklenen kalbin yapısal ve/veya fonksiyonel anormalliklerinden kaynaklanan semptomlar ve/veya belirtilerle karakterize bir klinik sendromdur (1).

Kalp yetmezliğinin dünyada yaklaşık 64 milyon insanı etkilediği prevelansının ise %2 civarında olduğu düşünülmektedir (2). Ülkemiz verilerine göre ise kalp yetmezliği prevelansı genç nüfusun daha fazla olmasına rağmen daha yüksektir (%2,9)(3).

Ejeksiyon fraksiyonu kalp yetmezliğinin gerek sınıflandırılmasında gerekse tedavinin şekillendirilmesinde en önemli parametrelerden biridir. Ejeksiyon fraksiyonu kalbe gelen toplam kanın (diastol sonu kan hacmi) ne kadarının dolaşıma verildiğinin (atım hacmi) oransal olarak ifadesidir. Klinik pratikte ejeksiyon fraksiyonu ölçümü için kullanılan en sık yöntem ekokar diyografidir. Son ESC(Avrupa Kalp Cemiyeti) kılavuzuna göre kalp yetmezliği HFrEF (Ejeksiyon fraksiyonu azalmış kalp yetmezliği): LVEF (sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu) $\leq 40\%$, HFmrEF (Hafif azalmış ejeksiyon fraksiyonu olan kalp yetmezliği): LVEF 41-49%, HFpEF (Korunmuş ejeksiyon fraksiyonu olan kalp yetmezliği): LVEF $\geq 50\%$ olmak üzere üç grupta toplanmıştır (4).

2.2. Kalp Yetmezliği Patofizyolojisi

Kalp yetmezliği tedavisi ve tedavinin yararı kalp yetmezliği tipine göre değişmektedir. Öyleki; EF'si düşük kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan çoğu ilacın EF'si korunmuş olan kalp yetmezliği vakalarında prognoz ve mortalite üzerine etkisi bulunamamıştır. Bu durum kalp yetmezliği patofizyolojisinin önemini ortaya koyar.

Kardiyak hasara yol açan primer olaydan sonra kalpte remodelling (yeniden şekillenme) meydana gelir. Yeniden şekillenme, kalp dokusunda oluşan hasarı takiben kalpte meydana gelen yapısal ve işlevsel değişiklikleri ifade eder. Belirli bir kardiyak olaya yanıt olarak kalbin boyutunda, kütleinde ve biçiminde değişiklikler olur. Frank-Starling yasası gereği kalp debisini sabit tutmak için artan sarkomer uzunluğu belli bir seviyeden sonra yeterli olamaz ve kalp atım hacmi düşer ve yeniden şekillenme tekrar aktive olur (5).

Kalp dokusunda oluşan hasarlanma sürecinde kardiyak dokuda hipertrofi, apoptozis, nekroz ve interstisiyel fibrozis ile karakterize patofizyolojik olaylar ventriküler hipertrofi ve dilatasyonla sonuçlanır. Tüm bu olaylar aynı zamanda remodelingin de bir parçasıdır (6).

Kalp yetmezliğinde nörohormonal aktivasyon kalp yetmezliği patofizyolojisinin temelini oluşturur. Nörohormonal aktivasyon sonucu sempatik sinir sisteminin aktivasyonu ve RAAS (renin anjiotensin aldosteron sistemi) aktivasyonu sonucunda vazokonstriksiyon, inflamasyon, su ve tuz tutulumu, kardiyak dokularda apoptozis ve nekroz ile karakterize birçok olay meydana gelir. Uzun dönemde bu aktivasyon transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzeyde genetik değişikliklere yol açar ve gitgide kalp yetmezliğinin ilerlediği bir kısır döngüyle sonuçlanır (7). Kalp yetmezliği tedavisinin temelini oluşturan beta blokerler, ace (anjiotensin dönüştürücü enzim) inhibitörleri, aldosteron antagonistleri ve son zamanlarda kullanıma giren ve kılavuzlarda kullanılması önerilen anjiyotensin reseptör–neprilisin inhibitörü olan sacubitril-valsartan tedavisi nörohormonal sistemi modifiye eden ve modern kalp yetmezliği tedavisinin ana unsuru olan ilaçlardır.

Kalp yetmezliği patofizyolojisinde sorumlu diğer unsurlar arasında immünmodülatör uyarılar sonucu salınan IL-1, IL-6, TNF-alfa gibi kemokinler, ICAM-1 gibi adezyon molekülleri monosit makrofaj aktivasyonu sıralanabilir. Yine oksidatif stresin artması kalp yetmezliğinin patofizyolojisinde rol alır ve artmış oksidatif stres de kardiyak hücrelerde apoptozis ve nekrozla sonuçlanır. Artmış oksidatif stres aynı zamanda mitokondriyal disfonksiyona sebep olur. Mitokondriyal disfonksiyon da apoptotik süreci aktive eder ve kalp yetmezliği patofizyolojisinde rol alır (8).

2.3. Düşük Ejeksiyon Fraksiyonlu Kalp Yetmezliği Tedavisi ve prognoz

Ülkemizde de temel olarak takip edilen ESC kalp yetmezliği kılavuzuna göre HFrEF hastalarında kullanılacak ilaçlar “Düşük ejeksiyon fraksiyonunun eşlik ettiği kalp yetmezliği tanısı konan tüm bireylerde uygulanması önerilen farmakolojik müdahaleler” ve “Düşük ejeksiyon fraksiyonunun eşlik ettiği kalp yetmezliği tanısı konan belirli bireyler için önerilen veya dikkate alınması gereken ek farmasötik ajanlar” olarak ikiye ayrılmıştır. HFrEF hastalarının tamamında uygulanması önerilen, hastalığa bağlı ölümü ve hastalığın progresyonunu önlediği birçok randomize kontrollü çok merkezli çalışma ile ispatlanan ilaçlar beta blokerler, ace inhibitörleri,

mineralokortikoid reseptör antagonistleri, anjiyotensin reseptör–neprilisin inhibitörü olan sacubitril-valsartan ve SGLT-2 (sodyum-glukoz transporter-2) inhibitörü ajanlar (bu gruptan çalışması olan dapaglifozin ve empaglifozin) olarak kılavuzda yer almıştır. Düşük ejeksiyon fraksiyonunun eşlik ettiği kalp yetmezliği tanısı konan belirli bireyler için önerilen veya dikkate alınması gereken ek farmasötik ajanlar ise loop diüretikleri, anjiyotensin reseptör blokerleri, if kanalı inhibitörleri, çözünür guanilat siklaz stimülatörü olan vericiguat, hidralazin ve izosorbid dinitrattır (4).

Son yıllarda kalp yetmezliği tedavisinde etkili yeni bir ajan yokken temelde diyabet tedavisi için dizayn edilen SGLT-2 inhibitörlerinin gerek diyabetik gerekse diyabetik olmayan kalp yetmezliği hastalarındaki tüm tedavi rejimlerine ek olarak mortalite ve morbiditede iyileşme sağlamış olması heyecan uyandırmıştır.

Kalp yetmezliği modern tıptaki tüm gelişmelere rağmen kötü prognozlu bir hastalık olmaya devam etmektedir ve her yaş grubu için beklenen ortalama ömürde ciddi düşüşe neden olmaktadır. Örneğin 70-74 yaş arası bireylerde Amerika Birleşik Devletleri'nde ortalama yaşam beklentisi 15 yıl iken kalp yetmezliği nedeni ile en az bir kez hastaneye yatan kişilerde bu rakam 3 yıla düşmektedir (9). Bundan ötürü kalp yetmezliği tedavisinde yeni modalitelere olan ihtiyaç devam etmektedir.

2.4. SGLT-2 İnhibitörleri

SGLT-2 reseptörleri yalnızca böbrek proksimal kıvrımlı tübüllerinde bulunur ve vücuttaki glikozun neredeyse tamamının ve glomerülde süzülen tuzun büyük bir kısmının geri emiliminde önemli bir rol oynar. Bu reseptörün bloke edilmesi diüretik bir yanıtla sonuçlanarak sodyum ve glikozun ortadan kaldırılmasına yol açar. Bu mekanizma, insüline bağımlı olmayan serum glikoz seviyelerini düşürmek için bir araç sunar ve böylece hipoglisemi potansiyelini önler. Randomize klinik çalışmalar, SGLT-2 inhibitörlerinin hemoglobin A1c seviyelerinde %0,5 ila %1,1 arasında değişen küçük bir düşüş sağlamadaki etkinliğine dair kanıt sağlamıştır (10). İlk oral sodyum-glukoz kotransporter-2 (SGLT-2) inhibitörü, sıçanlarda hiperglisemiye azaltmada etkinlik göstererek tip 2 diabetes mellitus (T2DM) tedavisinde olası bir terapötik uygulamayı düşündürmüştür (11). Diyabet tedavisi için kullanılması planlanan ajanların kardiyovasküler etkilerinin incelendiği çalışmalar bu ilaçların kalp yetmezliğinde kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır.

EMPA-REG Outcome çalışmasında empagliflozinin, standart tedaviyle birlikte kullanıldığında, tip 2 diyabet tanısı konmuş ve kardiyovasküler komplikasyon riski yüksek olan bireylerde kardiyovasküler morbidite ve ölüm oluşumu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Plasebo ve empagliflozin kullanan grup arasında miyokard enfarktüsü veya inme oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bununla birlikte, empagliflozin grubunda kardiyovasküler nedenlerden ölüm (plasebo grubundaki %5,9'a kıyasla %3,7, %38'lik bir göreceli risk azalması), kalp yetmezliği nedeniyle hastaneye yatış (plasebo grubundaki %4,1'e kıyasla %2,7, %35'lik bir göreceli risk azalması) ve herhangi bir nedenden ölüm (plasebo grubundaki %8,3'e kıyasla %5,7, %32'lik bir göreceli risk azalması) oranları önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur (12).

Bu bulgunun şaşırtıcı niteliği, ek paralel araştırmalar yoluyla doğrulama ihtiyacını gerektirmiştir. Canagliflozin ve Tip 2 Diyabette kardiyovasküler ve renal Olaylar (CANVAS) ve Dapagliflozin ve Tip 2 Diyabette kardiyovasküler sonuçlar (DECLARE TIMI) çalışmaları, sırasıyla canagliflozin ve dapagliflozinin etkileriyle ilgili olarak benzer sonuçlar vermiştir (13).

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) hastalarını içeren kardiyovasküler sonuç çalışmalarında kalp yetmezliğine bağlı kardiyovasküler mortalite ve hastaneye yatışlarda azalma olduğunun keşfedilmesi, ilacın kalp yetmezliği tedavisindeki potansiyelinin daha sonra araştırılmasına yol açmıştır. Dapagliflozin ve Kalp Yetersizliğinde Olumsuz Sonuçların Önlenmesi (DAPA-HF) çalışması, düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetersizliği (HFrEF) tanısı konan bireylerde bir sodyum-glikoz kotransporter-2 (SGLT-2) inhibitörünün etkinliğini değerlendirmek için yapılan ilk araştırmadır. 4744 HFrEF hastasının 18 ay boyunca takip edildiği çalışmada diyabetik durumlarına bakılmaksızın dapagliflozin uygulanan bireylerde, plasebo uygulanan bireylere kıyasla kalp yetmezliğinde kötüleşme veya kardiyovasküler nedenlere bağlı olarak hayatını kaybetme olasılığının anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (14).

Empagliflozin Outcome Trial in Patients With Chronic Heart Failure and a Reduced Ejection Fraction (EMPEROR-Reduced) çalışması olarak bilinen bir diğer çalışmada, empagliflozinin benzer bir grup bireydeki etkinliğini incelemiştir. Çalışmaya toplam 3.730 katılımcı dahil edilmiş ve bu katılımcıların ortalama takip süresi 16 ay olmuştur. Empagliflozin uygulaması, plasebo kullanımına kıyasla kardiyovasküler ölüm ve kalp

yetmezliğine bağlı hastaneye yatışların birleşik oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı biçimde %21’lik azalmayla sonuçlanmıştır (15).

Bütün bu çalışmaların ışığında SGLT-2 inhibitörlerinin diyabeti olsun ya da olmasın tüm kalp yetmezliği hastalarında kullanılması önerilmiştir. Kalp yetmezliği tedavisinde yer alan bu ajanların etki mekanizması ise tam olarak açıklanamamıştır. Bilinen mekanizmaları özetlemek gerekirse; Sodyum-glukoz kotransporter 2 (SGLT-2) inhibitörlerinin idrarla glukoz atılımını etkili bir şekilde artırarak kan şekeri seviyelerinin daha iyi kontrol edilmesine ve kalori kaybına bağlı olarak vücut ağırlığında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, SGLT-2 inhibitörlerinin erken natriüresi indükleyerek plazma hacminde azalmaya ve hematokrit seviyelerinde artışa neden olduğu bulunmuştur. Ek olarak, bu inhibitörler sistemik kan basıncında düşüşe, glomerüler hiperfiltrasyon ve albüminüride azalmaya ve kalp ve böbrekte metabolik substrat tercihinde keton cisimlerine doğru bir kaymaya yol açmaktadır. SGLT-2 inhibitörlerinin kardiyovasküler ve renal faydalarına katkıda bulunabilecek diğer potansiyel mekanizmalar arasında adipoz doku kaynaklı enflamasyonun zayıflaması ve ardından pro-enflamatuar sitokinlerin üretiminde azalma yer almaktadır. Ayrıca, bu inhibitörlerin oksidatif stresi azalttığı, miyokardiyal Na^+/H^+ değiştiricisini inhibe ettiği, serum ürik asit seviyelerini düşürdüğü ve ileri glikasyon son ürünleri ve bunların reseptörünü içeren sinyal yolunu baskıladığı gösterilmiştir (16).

SGLT-2 inhibitörlerinin geniş ölçekli randomize çalışmalarda çok çeşitli kardiyorenal sonuçlar üzerindeki olumlu etkilerine dair tutarlı ve önemli kanıtların yanı sıra nispeten düşük yan etki insidansı nedeniyle, bu terapötik ajanlar uluslararası kılavuzlarda glisemik kontrolü yönetmek ve kardiyovasküler olay riskini azaltmak için farmakolojik bir yaklaşımın önemli bir bileşeni olarak önerilmektedir.

2.5. Mikro RNA’lar

2.5.1. miRNA

Geleneksel genetik öğretisi DNA’dan transkripsiyon ile RNA sentezini ve RNA’dan translasyon ile protein sentezini anlatır. Ancak, transkripsiyona uğrayan RNA moleküllerinin önemli bir kısmı translasyona uğramamaktadır. Non-coding RNA (kodlanmayan RNA) olarak adlandırılan bu RNA kümesinin son zamanlarda yapılan çalışmalar ışığında aslında protein sentezinin düzenlenmesinde oldukça aktif rol aldığı gözlenmiştir. Non coding RNA (ncRNA) sınıfı nükleotid uzunluğuna göre 200

nükleotidden uzun olan uzun ncRNA ve nükleotid sayısı 200'ün altında olan kısa ncRNA olarak iki gruba ayrılmaktadır. MikroRNA'lar (miRNA'lar), yaklaşık 20-22 nükleotid (nt) uzunluğunda olan küçük kodlanmayan RNA'ların (ncRNA'lar) bir sınıfıdır (17).

Keşfedilen miRNA'ların önemli bir kısmı intronik veya intergenik bölgelerden transkribe edilir ve kendi spesifik promotörleri tarafından düzenlemeye tabidir. miRNA'lar transkripsiyon sürecinden sonra gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Bu düzenleme, miRNA'ların hedef mesajcı RNA'ların (mRNA'lar) belirli bölgelerine, yani çevrilmemiş 3' bölgeye (UTR), ağlanması yoluyla gerçekleşir. miRNA'ların bu bölgelere bağlanması, mRNA moleküllerinin translasyonunun engellenmesine veya yıkımına yol açar (18).

1993 yılında Lin-4 adındaki ilk mikroRNA tanımlanmıştır. *Caenorhabditis elegans* nematodunda larval evreler arasında geçişi kontrol eden heterokronik genler bulunmuştur. Lin-4 buna bir örnektir. Lin 4 işlev kaybı mutasyonlarına sahip hayvanlar, belirli yetişkin anatomik özelliklerinde bir eksiklik sergileyerek onları yumurtlayamaz hale getirir ve elverişsiz geç larva aşamaları sırasında erken gelişim programlarının uygun şekilde yürütülmesini engeller. Lin 4'ün aktivitesi, larva gelişiminin L1 aşamasından L2 aşamasına geçişi için gereklidir. 1987 yılında Ferguson ve arkadaşları lin-14 genindeki null mutasyonunun oluşturduğu etkinin lin 4'deki null mutasyonunun oluşturduğunun tersi yönünde olduğu saptanmıştır. Bu da lin-4'ün lin-14'ün negatif düzenleyicisi olabileceği görüşünü doğurmuştur (19).

Daha sonra Ambros ve Ruwkin isimli iki araştırmacı farklı laboratuvarlarda Ruwkin lin-14 ve Ambros lin-4 üzerinde olmak üzere birbirlerinden bağımsız çalışmalar yürütmüş ve sonrasında benzer sonuçlar bulduklarını görerek ayrı ayrı 1993 yılında Cell'de yayınlamış ve ilk miRNA'ı ve miRNA'ların temel çalışma prensibini ortaya koymuşlardır. Bu araştırmacılar göstermiştir ki; lin-4 geni için bir başlatıcı ya da stop kodonu bulunmamaktadır ve lin 4 belirli bir protein kodlamamaktadır. Lin-4'ün 22 ve 61 nükleotidli iki transkripti bulunmuştur. Lin-14 üzerinde 3'UTR bölgesinin varlığı lin 4 -lin 14 etkileşimi için yeterli görülmektedir. Dolayısıyla kendisi kodlanarak protein üretmeyen ama diğer bir genin 3UTR bölgesine bağlanarak posttranskripsiyonel olarak etkileşim gösteren yeni bir RNA tipinin yani miRNA'nın keşfi gerçekleşmiştir (20,21,22).

Yedi yıl sonra diğerk bir miRNA olan let-7'nin bu sefer geç larval gelişimde etkisi saptanarak yine Caenorhabditis elegansın üzerinde bulunmuştur. Ancak let7'nin lin-4'ten farklı olarak bitkiler ve tek hücreliler dışında hemen hemen tüm organizmalarda bulunması ve insanda da let7 ailesine bağlı yaklaşık 12 tane miRNA'in görölmesi mikroRNA'lar üzerinde birçok yeni bilginin elde edilmesine ve işlevlerinin birçok fizyolojik olayda ve hastalıkta incelenmesine yol açmıştır (23).

MikroRNA (miRNA) araştırma alanı hızlı ve dinamik gelişmelerden geçmektedir. řu an itibariyle, insanlarda tanımlanan mikroRNA'ların (miRNA'lar) sayısı 2000'i aşmıştır (24).

2.5.2. miRNA Biyogenez

miRNA (mikro RNA) biyogenez süreci tipik olarak enzimlerin ve proteinlerin karmaşık bir etkileşimi ile sağlanır. miRNA biyogenezi kanyonik ve nonkanyonik yol olmak üzere iki şekilde olabilir.

İlk önce RNA polimeraz II tarafından transkripsiyon yoluyla pri- miRNA olarak bilinen uzun bir RNA molekülü oluşur. Daha sonra çekirdek içinde pri miRNA DGCR8 proteini ve Drosha olarak bilinen RNA polimeraz III tarafından yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda pre miRNA oluşumu gerçekleşir. Exportin-5 ve Ran-GTP protein kompleksinin yardımı ile pre miRNA çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Hücre içinde pre miRNA RNA-III endonükleaz ile 20-22 nükleotidli olgun miRNA'e dönüşür. miRNA Argonaute proteinlerinden oluşan RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) olarak bilinen bir protein kompleksine sokulur. RISC kompleksi miRNA molekülünün spesifik hedef mRNA'ya doğru yönlendirilmesinden sorumludur. MikroRNA (miRNA), mesajcı RNA'nın (mRNA) 3' çevrilmemiş bölgesi (3' UTR) ile tam veya kısmi tamamlayıcılık sergiler. Bu etkileşim sonucu mRNA translasyonunun inhibisyonu veya mRNA degradasyonu meydana gelir. mRNA yıkımı RNA deadenilasyon enzimleri ile olur (25,26,27).

Çeşitli alternatif miRNA biyogenez yolları tanımlanmış ve açıklığa kavuşturulmuştur (şekil 1). Bu yollar, çoğunlukla Drosha, Dicer, exportin 5 ve AGO2 dahil olmak üzere geleneksel yolda yer alan proteinlerin farklı kombinasyonlarını kullanır. Genel olarak, miRNA'nın kanonik olmayan üretimi iki yol olarak sınıflandırılabilir: Drosha ve DGCR8 enzimlerinden bağımsız olanlar ve Dicer enziminden bağımsız olanlar.

Drosha/DGCR8'den bağımsız yolla üretilen pre- miRNA'lar Dicer substratlarına benzerlik gösterir. Bahsedilebilecek pre- miRNA'ların bir örneği, mRNA'nın intronlarından splicing işlemi yoluyla üretilen miRtronlardır (28).

2.5.3. miRNA fonksiyonları ve kardiyovasküler hastalıklardaki yeri

MikroRNA'lar (miRNA'lar) hücre gelişimi, farklılaşması ve homeostazının düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Otokrin, parakrin veya uzak sinyal mekanizmaları olarak işlev görebilirler. Bunun nedeni miRNA'ların sistemik dolaşıma salgılanma ve proteine bağlı bir formda ya da veziküller yoluyla taşınma yeteneğine sahip olmasıdır. Bu durum, çok çeşitli hastalıklar için miRNA tabanlı biyobelirteçlerin geliştirilmesini amaçlayan girişimlerin ortaya çıkmasının yanı sıra, miRNA tabanlı terapötik müdahalelerin oluşturulması nihai hedefiyle gen ifadesinin düzenlenmesi amacıyla miRNA tabanlı araştırma metodolojilerinin ilerlemesiyle sonuçlanmıştır (18).

Kalp yetmezliği patofizyolojisi de içinde birçok enzim, hormon, sitokin gibi birçok molekülü içeren apoptois, nekroz, yeniden şekillenme gibi bir sürü karmaşık süreci içerir. Dolayısıyla protein sentezinde düzenleyici görevi olan miRNA'ların kalp yetmezliği patofizyolojisinde de aktif rol oynaması olasıdır. Miyokardiyal İskemi, iskemik olmayan kardiyomiyopatiler, hipertrofik kardiyomiyopati, kardiyak amiloidoz, aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati ve Takotsubo kardiyomiyopatisi mikroRnaların aktif rol aldığı kardiyovasküler hastalıklardır (18).

Hem kalp yetmezliği için bir biomarker olarak hem de kalp yetmezliği tedavisinde terapötik bir hedef olarak miRNA'lar dikkat çekmektedirler. Nitekim 17. insan kromozomu üzerinde bulunan miR-212-132 geninden üretilen bir mikroRNA olan miR-132'nin baskılanmasının, FoxO3 ve Serca2a seviyelerinin yükselmesine yol açtığı ve sonuçta kardiyak performansın arttığı gösterilmiştir. İnhibisyon, CDR132L olarak bilinen kimyasal olarak modifiye edilmiş bir oligonükleotidin uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma 28 kalp yetmezliği hastası üzerinde yapılan faz 1 çalışması olarak geleceğe dair umut vadetmiştir (29).

2.5.4. Çalışmamızda kullanılan miRNA'lar ve Kalp yetmezliğindeki yerleri

miR-499:

miR-499 kardiyak spesifik bir mikrona olarak tanımlanmıştır. Akut koroner sendromda seviyesi yükselmektedir. Ayrıca kardiyak hasarın olduğu miyokardit gibi

tablolarda ve akut kalp yetmezliğinde miR-499 seviyesi yükselmektedir. Plazma miR-499 seviyeleri akut miyokard enfarktüsünü (AMI) takiben belirgin bir yükselme gösterir ve kardiyak hasar belirteçleri ile pozitif bir korelasyon göstermektedir (30,31).

miR-21:

miR-21 kardiyak miyosit, kardiyak fibroblast, vasküler düz kas hücresi, endotel hücreleri gibi kardiyovasküler sistemin birçok hücresinde bulunan bir miRNA'dır. miR-21'in birçok hedef hücre ve fonksiyonunun olması kardiyovasküler sistemdeki etkilerinin kimi durumlarda farklı olmasına yol açmaktadır (32).

miR-21'in kardiyoprotektif etkileri:

miR-21 kalp hücreleri üzerinde antiapoptotik, antiinflamatuvar etkilere sahiptir. miR-21 apoptozisde önemli rolü olan Bcl-2 benzeri molekül (bax) ve caspaz 3'ün ekspresyonunu arttırmaktadır. miR-21 aynı zamanda antiinflamatuvar moleküllerin salınımını aktive etmekte ve kardiyak kök hücre proliferasyonuna katkıda bulunmaktadır (32).

miR-21'in olası olumsuz etkileri:

Kardiyak fibrozis kalp dokusunda oluşan hasara sekonder olarak dokunun cevap verdiği bir iyileşme şekli olmakla beraber fibrozis kalp yetmezliğinin gelişimine sebep olan ve kardiyak dokunun kaybıyla sonuçlanan bir süreçtir. miR-21 kardiyak fibroziste aktif olarak rol oynamaktadır. Fibroze yol açan birinci yolak TGFβ-1 upregülasyonu ile kardiyak fibroblastların aktivasyonu ve miyofibroblastlara dönüşümünün artırılması, diğer bir mekanizma ise Sprouty (Sepy) gen ailesinin bir üyesi olan spry1'in inaktivasyonunu sağlayarak Spry1'in fibroblast aktivasyonunu arttırıcı etkisini inhibe etmesi ve sonuç olarak fibrozisin aktivasyonuna yol açmasıdır (33).

miR-132:

miR-132'nin kardiyovasküler hastalıkla ilişkili patofizyolojik mekanizmaların düzenlenmesinde potansiyel olarak önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu mekanizmalar miyokardiyal hipertrofi, otofaji, fibroz, apoptoz, anjiyogenez, kalsiyum kullanımı, nöroendokrin aktivasyonu, oksidatif stresin yanı sıra endotelial ve vasküler düz kas hücre biyolojisini kapsamaktadır.

miR-132'nin inhibisyonu

miR-132 bazlı tedavilerin iki şekli mevcuttur: anormal şekilde yükselmiş miR-132'yi inhibisyon yoluyla bastırmak ve zayıflatılmış miR-132'yi takviye yoluyla eski haline

getirmek. miR-132 aktivitesini in vivo olarak modüle etmek için, baskılama için çeşitli kimyasal modifikasyonlara sahip antisens oligonükleotidler (ASO'lar) ve restorasyon için çift sarmallı mimikler kullanmak gibi birçok yol belirlenmiştir. CDR132L, sınıfının ilk inhibitörü olan miR-132'nin sentetik bir antisens oligonükleotid inhibitörüdür (34,35).

CD132L ile yapılmış hayvan deneylerinde CD132L'nin miR-132'i inhibe ederek kalp yetmezliğine bağlı bulguları azalttığı ve hipertrofiyi azalttığı gösterilmiştir.

İnsanlarda ilk kez gerçekleştirilen Faz 1b randomize, çift kör, plasebo kontrollü klinik çalışmada, standart tedavi gören kronik iskemik kalp yetmezliği hastalarında CDR132L'nin güvenliği, farmakokinetiği ve etkinliği incelenmiştir. Bu çalışmada, LVEF %30-50 veya NT-proBNP ≥ 125 ng/L, yaş 30-80 ve BMI 18-28 kg/m² olan 28 hasta rastgele 5:2 oranında CDR132L grubuna (20 hasta, kohort başına 5 hasta 0,32, 1, 3 ve 10 mg/kg vücut ağırlığı) ve plasebo grubuna (sekiz hasta, %0,9 salin) atanmıştır. 6 haftalık bir tarama döneminden sonra, hastalar 1. ve 28. günlerde iki intravenöz CDR132L veya plasebo dozu almıştır. Çalışma 112. günde sonlandırılmıştır. Bu çalışmada CDR132L güvenli bulunmuş ve iyi tolere edilmiştir. CDR132L tedavisi doza bağlı bir şekilde plazma miR-132 seviyelerini kalıcı ve keskin bir şekilde azaltmıştır. Geleneksel tedavi alan iskemik kronik kalp yetmezliği hastaları için CDR132L, medyan NT-proBNP seviyesini daha da azaltabilir, QRS dalgasını daraltabilir ve plaseboya kıyasla anlamlı olmayan kardiyak fibroz biyobelirteçlerini artırabilir. Bu, kardiyovasküler hastalık miRNA tedavisinde bir kilometre taşı olan miR-132'yi hedef alan ilk insan araştırmasıdır

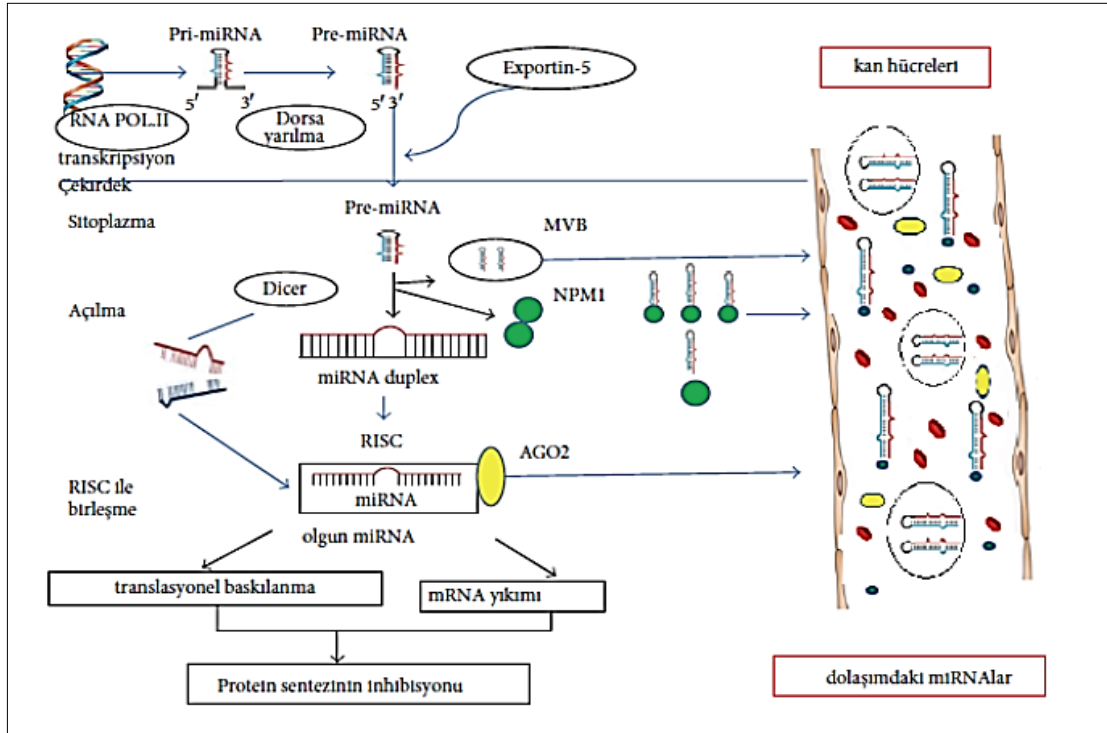
Çoğu çalışma miR-132 aşırı ekspresyonunun kalp hastalığına katkıda bulunduğunu gösterirken, az sayıda çalışma miR-132 yukarı regülasyonunun potansiyel faydalarını incelemiştir. Gupta ve arkadaşları miR-132 aşırı ekspresyonunun kemoterapi ilaçlarından kaynaklanan kardiyak hasarı azaltabileceğini bulmuşlardır (36).

miR-210:

miR-210, hipoksi ile upregüle olan apoptozu inhibe eden ve hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, göçünü, mitokondriyal metabolizmayı ve anjiyogenezi düzenleyen bir mikroRNA'dır. Ateroskleroz, akut miyokard enfarktüsü, preeklamps, aort stenoza ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarda miR-210'un aşırı ekspresyonu hedef organları korur. Ayrıca, kronik olarak artan miR-210 bazı durumlarda zararlı olabilir.

miR-210'un çeşitli klinik durumlarda hücrel hasarın varlığının ve ciddiyetinin değerlendirmesinin bağımsız bir biyobelirteci olarak kullanılabileceğine dair kanıtlar vardır. miR-210, özellikle kök hücre ve kalp nakilleri sırasında kalp dokusunu koruyabilir. miR-210 overekspresyonu genellikle kardiyoproteksiyona yol açmaktadır (37,38).

Sonuç olarak, bir hipoksi miRNA'sı olan miRNA-210, KVH'lerin tedavisi için önemli bir umut vaat etmektedir.



Şekil 2.1. miRNA biyogenezi (Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Value of Circulating miRNAs in Heart Failure Patients Associated with Oxidative Stress Oxid Med Cell Longev 2016;2016:5893064'dan alınmıştır)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Çalışmamız 40 adet diabetes mellitus tanılı sistolik kalp yetmezliği hastası ve 20 adet sağlıklı gönüllüden oluşmaktadır. Çalışmamıza 18-75 yaş arası bireyler dahil edilmiştir.

Çalışmamızda Gaziantep Üniversitesi Endokrinoloji Kliniğinde tip 2 diabetes mellitus ile takip edilip SGLT-2 inhibitörü ilaç başlanması planlanan hastalardan kliniğimizce takip edilen ve kliniğimizde ejeksiyon fraksiyonu %40'ın altında olduğu tespit edilen stabil hastalar dahil edilmiştir. Endokrinoloji tarafından SGLT-2 inhibitörü başlanan hastalar kliniğimizde tekrar değerlendirilmiş ve hastaların ekokardiyografik incelemeleri tekrar yapılmış ve kalp yetmezliği tedavisi olarak optimal medikal tedavi aldıkları kontrol edilmiştir. Zira SGLT-2 inhibitörü kullanımını sonrası mecbur kalınılmadığı sürece hastaların herhangi ek bir ilaç almaması istenmiştir.

Hastalara SGLT-2 inhibitörü başlanmadan önce EDTA'lı tam kan tüpüne kan alınmış ve sonrasında RNA koruyucu solüsyon ile muamele edildikten sonra kanlar -80 derecede saklanmıştır.

Aynı hastalardan üç ay sonra tekrar kan alınarak aynı işlem tekrarlanmıştır. Bu üç aylık dönemde ek ilaçlar kullanmak zorunda kalan ya da hastaneye yatış gerektirip farklı medikal tedavi alan hastalar çalışmadan çıkarılmıştır.

Sağlıklı gönüllüler ise hastanemize rutin kontrol için başvuran ve herhangi bir hastalığı olmayan bireylerden oluşturulmuştur Sağlıklı gönüllülerden sadece bir kez kan alınmıştır.

Gerek sağlıklı gönüllü, gerekse hastalardan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

3.1.1. Hastaların çalışmaya dahil olma kriterleri

1-18-75 yaş arası tip2 diabetes mellitus ve sistolik kalp yetmezliği nedeniyle takip ediliyor olmak

2-Çalışmaya dahil edildiği esnada hastanın kalp yetmezliği ile ilgili beta bloker -ace inhibitörü vb. kalp yetmezliği tedavisini optimal dozda kullanıyor olması

3-Hastanın endokrinoloji tarafından SGLT-2 inhibitörü ilaca başlanmasına karar verilmiş olması

4-Hastanın çalışmaya alındığı esnada stabil kompanse vaziyette olması

3.1.2. Hastaların çalışmadan dışlanma kriterleri

- 1-Hastanın SGLT-2 inhibitörü başlandıktan sonra 3 ay içinde herhangi bir planlı ameliyat vb. işleminin olması
 - 2-Kanser nedeniyle takipte olan hastalar
 - 3-Otoimmün hastalık nedeniyle takipte olanlar
 - 4-Gebelik şüphesi ya da planlaması olanlar
 - 5-Son dönem böbrek yetmezliği nedeniyle diyalize giren hastalar
- Şeklinde özetleyebiliriz.

3.1.3. Kan Örneklerinin Toplanması ve Çalışılması

Hastalardan SGLT-2 inhibitörü başlanmasından önce ve ilaç kullanımını takiben üçüncü ayda toplamda iki kez sağlıklı gönüllülerden ise bir kez olmak üzere 2cc EDTA'lı kan tüpüne kan alındıktan sonra Rna koruyucu ile beraber kanlar eppendorfa alınarak -80 derecede çalışma yapılıncaya kadar saklandı

Tam kandan RNA izolasyonu:

RNA stabilizasyon solüsyonu içerisinde bekletilen kan örneklerinden PureLink RNA Mini Kit (Cat No: 12183018A, 12183025) kullanılarak ve aşağıdaki adımlar izlenerek RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. 200 µL kan 1.5 ml'lik eppendorfa alındı.
2. Üzerlerine □-Mer eklenmiş 200 µL Lysis Buffer eklendi.
3. Eppendorf tüpler santrifüje alınarak 12.000 x g'de 2 dk vortekslendi.
4. Supernatant temiz bir 1.5 ml eppendorfa alındı.
5. Eppendorfa 200 µL (1.5 hacim) % 100 etanol eklendi. Presipitat iyice dağılana kadar, vorteks-pipetaj işlemi uygulandı.
6. Örnekler presipitatı ile birlikte Collection Tüplü Spin Cartridge e alındı ve 12.000 x g; 15 sn santrifüjlendi. Ardından süpernatant uzaklaştırıldı.
7. Spin Cartridge aynı Collection Tüpe yerleştirilerek 700 µL Wash Buffer I eklendi ve 12.000 x g; 15 sn santrifüj edildi. Ardından supernatant ve Collection tüp atıldı. Spin Cartridge üzerine yeni bir Collection tüp yerleştirildi.
8. Spin Cartridge üzerine 500 µL etanollü Wash Buffer II eklendi.
9. 12.000 x g; 15 sn. santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Spin Cartridge aynı Collection tüpe yerleştirildi.
10. Spin Cartridge üzerine 500 µ L etanollü Wash Buffer II ekle.
11. 12.000 x g; 15 sn. santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Spin Cartridge aynı

Collection tüpe yerleştirildi.

12. Spin Cartridge 12.000 x g'de 1 dk RNA bağlanmış membranı kurutmak için santrifüj edildi.

13. Collection tüp atıldı. Spin Cartridge Recovery tüpe yerleştirildi.

14. 100 µL RNase-Free Water Spin Cartridge'ın ortasına bırakıldı.

15. 1 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

16. Spin Cartridge ve Recovery tüpü 12.000 x g; 2 dk. Santrifüj edildi.

17. Spektrofotometrik ölçümler yapılarak ardından RNA örnekleri hızlıca -80°C'e kaldırıldı.

cDNA Aşaması

1. RNA örnekleri buz üzerinde nazıkçe çözdürülerek, RT reaksiyonu başına 1 µg kadar kullanıldı.

2. ID3EAL miRNA RT Tamponu (4x) ve ID3EAL RT Primer 1-pleksleri (20x) çözdürülüp, vortekslenerek karıştırıldı ve santrifüjleme ile aşağı yöne doğru spinlendi.

3. RT reaksiyonu Tablo 3.1'e göre hazırlanarak karışım haline getirildi. Ters Transkriptaz enzimi -20°C'de tutularak ana karışıma en son eklendi.

Tablo 3.1. cDNA reaksiyonu için gerekli bileşenler

Reaktif	Hacim
Kalıp RNA (1 µg'a kadar)	x µl
ID3EAL RT Buffer (4x)	5 µl
ID3EAL RT Primer 1-plex 1 (20x)	1 µl
ID3EAL RT Primer 1-plex N (20x)	1 µl
ID3EAL Reverse Transkriptaz (20x)	1 µl
Nükleaz içermeyen su	20 µl'ye
Toplam Hacim	20 µl

4. Birleştirilen reaktifleri iyice karıştırıldı ve kısaca vortekslendi.

5. Reaksiyon öncelikle 42°C'de 30 dakika inkübe edildi, ardından 5 dakika 95°C'de ısıyla inaktivasyon gerçekleştirilerek tamamlandı.

Real-Time PCR (qPCR) Aşaması

1. cDNA, ID3EAL miRNA qPCR Master Mix (2x) ve ID3EAL miRNA qPCR bileşenleri (10x), buz üzerinde nazıkçe çözündürüldü. Vorteksenerek karıştırıldı ve santrifüjleme ile aşağı yöne doğru spinlendi.
2. cDNA nükleaz içermeyen suda 1:10 oranında seyreltildi. Seyreltilmiş cDNA örnekleri Tablo 2'de gösterildiği gibi her bir PCR reaksiyon kuyusuna pipetlendi.
3. qPCR reaksiyonunu Tablo 3.2'ye göre birleştirildi.

Tablo 3.2. qPCR reaksiyonu için gerekli bileşenler

Reaktif	Hacim / μ L
ID3EAL qPCR Master Mix (2x)	10
Nükleaz içermeyen su	3
ID3EAL qPCR assays (10x)	2
Dilüe edilmiş cDNA	5
Toplam Hacim	20

4. PCR plakası kısa süre (200 g'de 30 s) santrifüjlendi.
5. Tablo 3.3'te verilen döngü parametreleriyle Gerçek Zamanlı PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. Döngü parametreleriyle Gerçek Zamanlı PCR amplifikasyonu

Döngü	Sıcaklık	Zaman	Açıklama
1x	95°C	10 dk	Polimeraz
	40°C	5 dk	Aktivasyonu
40x	95°C	10 sn	Denatürasyon
	60°C	30 sn	Birleşme/Uzama

3.2. İstatistik Analiz Yöntemleri

Sağlıklı gönüllü, kalp yetmezliği hastası ve SGLT-2 inhibitörü kullanımı sonrası 3. ay miRNA Seviyeleri oransal olarak karşılaştırıldı. Çalışmalar üç tekrarlı olarak yapılmış olup, miRNA Seviyelerinin sağlıklı gönüllü, kalp yetmezliği hastası ve SGLT-2 inhibitörü kullanımı sonrası 3. ay seviyelerinin oransal olarak karşılaştırılması için kantitatif değerlendirme yöntemi kullanıldı. Yöntemin temelinde, analiz edilen miRNA ekspresyon düzeyinin; (Ct değeri) grupları arası kat değişiminin belirlenmesine

dayanmaktadır. Real-time-PCR ile miRNA ekspresyon tayininde örnekler housekeeping gen olan U6 ile normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplanarak örnekler arası miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Aşağıdaki gibi formüle edilmiştir:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta\Delta CT \text{ örnek} - \Delta\Delta CT \text{ kontrol})}$$

ΔCt (örnek) = Ct hedef gen değeri – Ct referans gen değeri

ΔCt (kontrol) = Ct hedef gen değeri – Ct referans gen değeri

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt (örnek) değeri - ΔCt (kontrol) değeri şeklindedir.

$\Delta\Delta Ct$ değerleri kullanılarak belirlendi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplandı.

3.2.1. miRNA Seviyelerinin İstatistiksel Analizi

Sürekli değişkenleri tanımlamak için deskriptif istatistikler kullanılmıştır. (ortalama, standart sapma, minimum, medyan, maksimum)

Normal dağılıma uygunluk gösteren 2 grup sürekli değişken arasındaki karşılaştırma Student t testi ile yapılmıştır.

Normal dağılıma uygunluk göstermeyen 2 grup sürekli değişken arasındaki karşılaştırma Mann Whitney u testi ile yapılmıştır.

İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak belirlenmiştir. IBM Corp. Released 2021. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0. Armonk, NY: IBM Corp. Programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamıza 40'ı diabetik ve sistolik kalp yetmezliği olan 20'si ise sağlıklı gönüllü olmak üzere toplam 60 kişi alınmıştır. Hasta grubunun ve sağlıklı gönüllülerin yaş, cinsiyet ve kullandığı ilaçlar tablo 4.1' ve tablo 4.2'de özetlenmiştir. Kalp yetmezliği grubunun ortalama ejeksiyon fraksiyonu %34'tür.

Tablo 4.1. Hastaların ve sağlıklı gönüllülerin demografik özellikleri

	Kalp yetmezliği	Sağlıklı gönüllü
Cinsiyet	Erkek Kadın	18(45) 12(60) 22(55) 8(40)
Yaş	Ort±SS 68 ±9,9	30,3±2,7

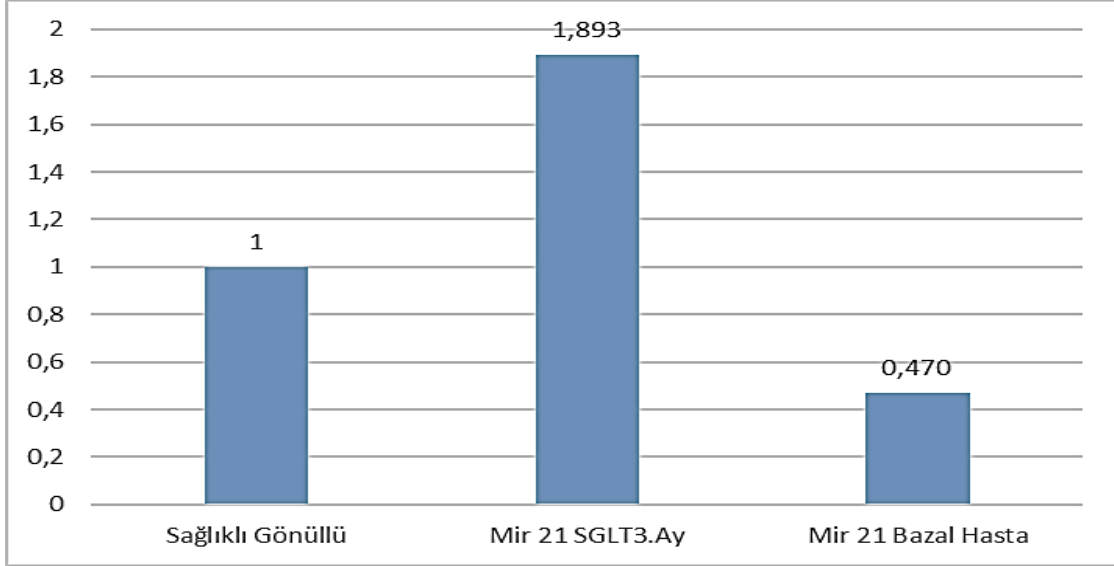
Tablo 4.2. Kalp yetmezliği hastalarının SGLT-2 inhibitörü kullanımı öncesi kullandığı ilaçlar

	N%
Antiagregan	32(80)
Beta bloker	38 (95)
İvabradin	10 (25)
Ace inhibitörü	32 (80)
Anjiotensin reseptör blokleri	8 (20)
Statin	27 (67,5)
Loop diüretik	19 (47,5)
Mineralokortikoid reseptör antagonisti	23(57,5)

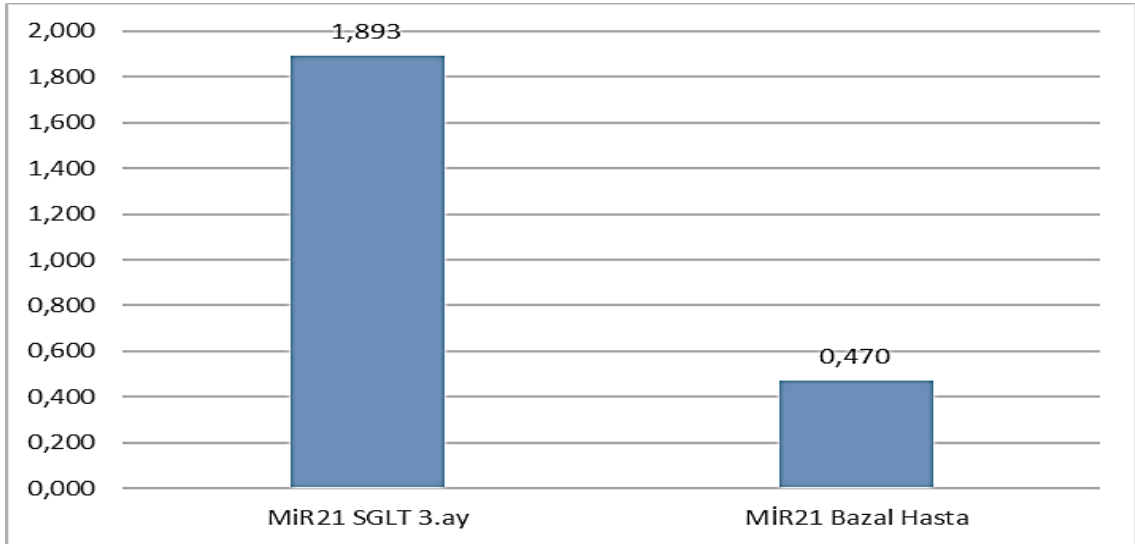
4.1. miR-21'in gruplar arası kıyaslaması

miR-21'in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre gruplar arası kıyaslaması yapıldığında miR-21 ekspresyonunun sağlıklı gönüllülere göre hasta SGLT-2 inhibitörü almayan bireylerde yaklaşık yarı yarıya daha düşük olduğu ancak SGLT-2 kullanımını takiben miR-21 ekspresyonunun bazal değerlere göre yaklaşık 4 kat arttığı saptanmıştır. Yapılan istatistiki değerlendirmede miR-21 seviyeleri arasında

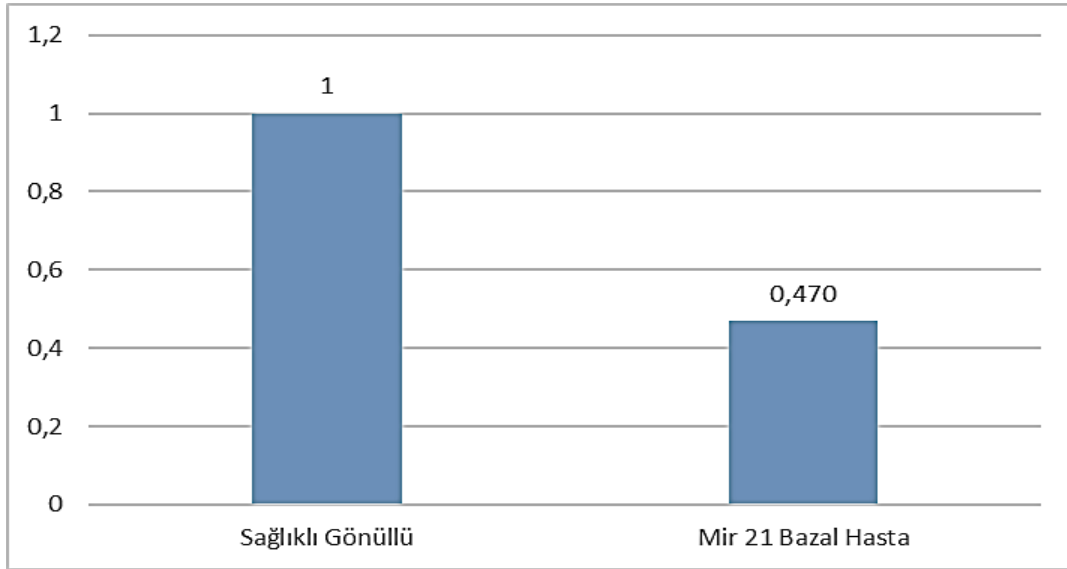
sağlıklı gönüllü ile SGLT-2 inhibitörü başlanmış hastalar arasında fark olmadığı, ancak SGLT-2 inhibitörü kullanımı sonrası SGLT-2 inhibitörü kullanan hastaların 3. ay değerleri ile ilaç başlanmamış kalp yetmezliği hastaları arasında istatistiksel fark saptanmıştır.



Şekil 4.1. miR-21'in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların SGLT-2 kullanımı öncesi ve SGLT-2 kullanım sonrası 3. ay karşılaştırılması



Şekil 4.2. miR-21'in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre SGLT-2 kullanımı sonrası ve öncesi hasta grubunun kendi içinde karşılaştırılması



Şekil 4.3. miR-21'in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların ilaç kullanımı öncesi bazal değerlerinin karşılaştırılması,

Tablo 4.3. miR-21 düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Sağlıklı gönüllü	SGLT-2 inhibitörü almayan hasta	3 ay süreyle SGLT-2 inhibitörü kullanan hasta	P (Sağlıklı gönüllü-SGLT-2 kullanmayan)	P (SGLT-2 kullanan / SGLT-2 kullanmayan)
miR-21	Ort±S.S 3.1±4.1	Ort±S.S 10.2±8.3	Ort±S.S 1.4±2	0.271 ¹	0.005¹

$p < 0,05$, ¹Mann Whitney u test, ²Student t test

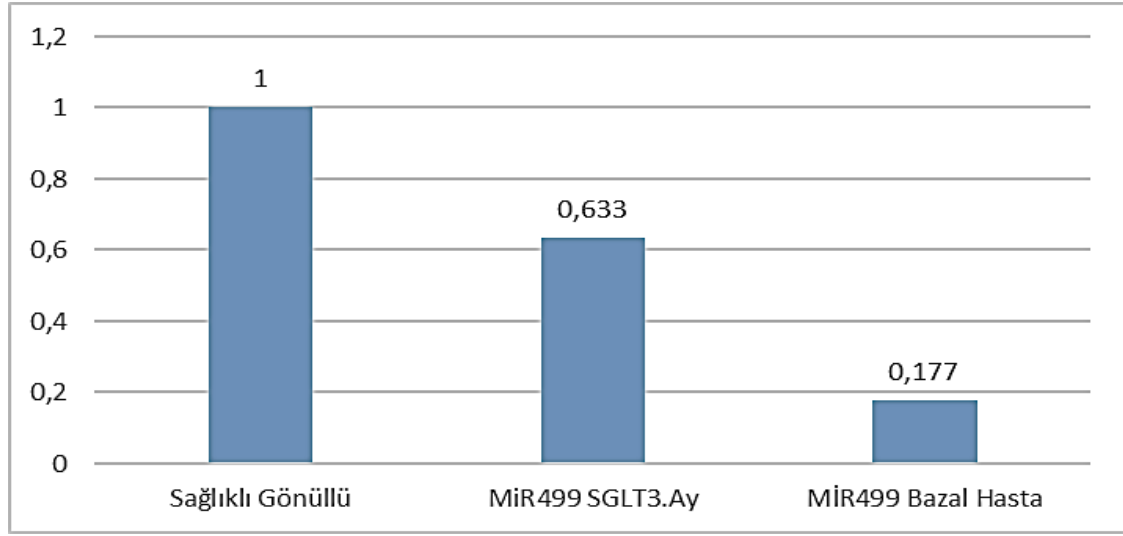
4.2. miR-499'un gruplar arası kıyaslaması

miR-499'un $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre gruplar arası kıyaslaması yapıldığında miR-499 ekspresyonunun sağlıklı gönüllülere göre hasta SGLT-2 inhibitörü almayan bireylerde yaklaşık 6 kat daha düşük olduğu ancak SGLT-2 inhibitörü ilaç kullanımını takiben miR-499 ekspresyonunun bazal değerlere göre yaklaşık 3,5 kat arttığı saptanmıştır. Yapılan istatistiki değerlendirmede miR-499 seviyeleri arasında gerek sağlıklı gönüllü ile SGLT-2 inhibitörü başlanmamış hastalar arasında, gerekse SGLT-2 inhibitörü kullanımı sonrası SGLT-2 inhibitörü kullanan hastaların 3. ay değerleri ile ilaç başlanmamış kalp yetmezliği hastaları arasında istatistiksel fark saptanmıştır.

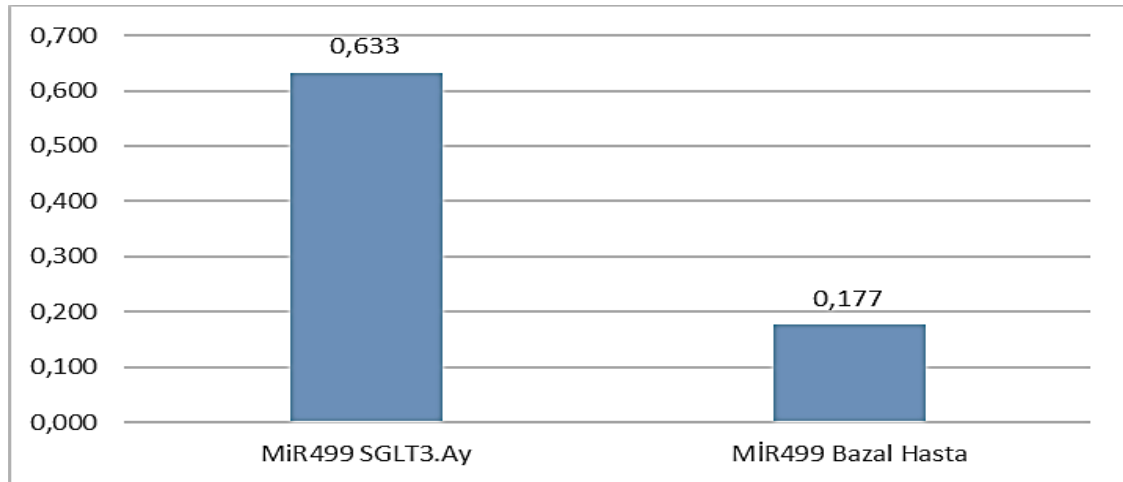
Tablo 4.4. miR-499 düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Sağlıklı gönüllü	SGLT-2 inhibitörü almayan hasta	3 ay süreyle SGLT-2 inhibitörü kullanan hasta	P (Sağlıklı gönüllü-SGLT-2 kullanmayan)	P (SGLT-2 kullanan / SGLT-2 kullanmayan)
miR-499	Ort±S.S 2.2±3.5	Ort±S.S 3.7±6.2	Ort±S.S 1.4±4.7	<0.001¹	0.005¹

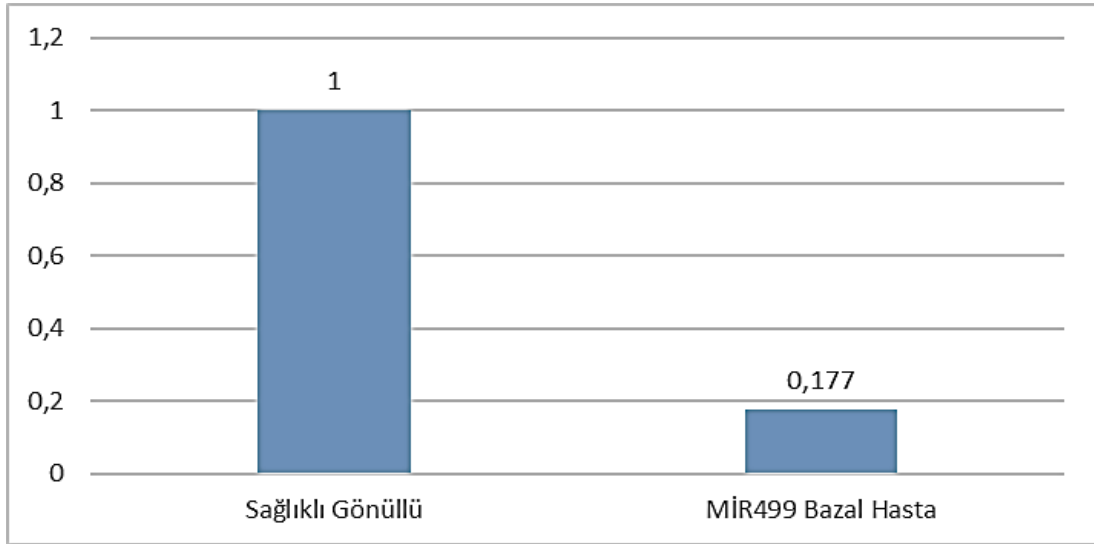
p<0,05, ¹Mann Whitney u test, ²Student t test



Şekil 4.4. miR-499'un $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların SGLT-2 kullanımı öncesi ve SGLT-2 kullanım sonrası 3. ay karşılaştırılması



Şekil 4.5. miR-499'in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre SGLT-2 kullanımı sonrası ve öncesi hasta grubunun kendi içinde karşılaştırılması



Şekil 4.6. miR-499'un $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların ilaç kullanımı öncesi bazal değerlerinin karşılaştırılması

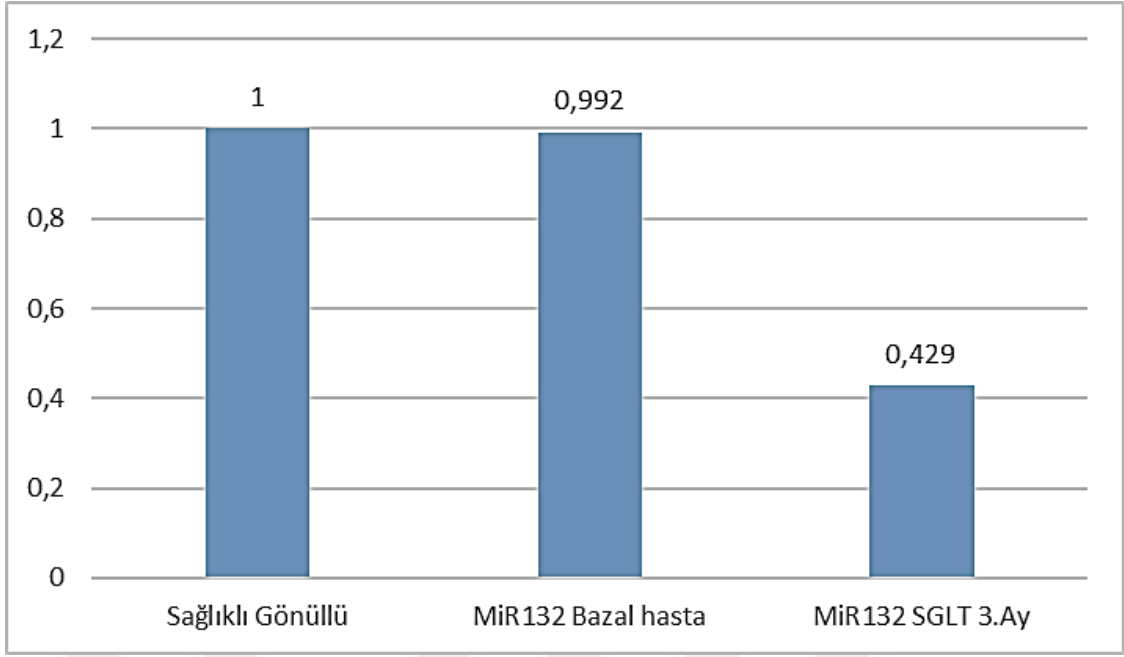
4.3. miR-132'nin gruplar arası kıyaslaması

miR-132'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre gruplar arası kıyaslaması yapıldığında miR-499 ekspresyonunun sağlıklı gönüllüler ile hasta SGLT-2 inhibitörü almayan bireylerle hemen hemen aynı olduğu ancak SGLT-2 kullanımının takiben miR-132 ekspresyonunun bazal değerlere göre yaklaşık %50 oranında düştüğü görülmüştür. Yapılan istatistiki değerlendirmede miR-132 seviyeleri arasında gerek sağlıklı gönüllü ile SGLT-2 inhibitörü başlanmamış hastalar arasında, gerekse SGLT-2 inhibitörü kullanımı sonrası SGLT-2 inhibitörü kullanan hastaların 3. ay değerleri ile ilaç başlanmamış kalp yetmezliği hastaları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır.

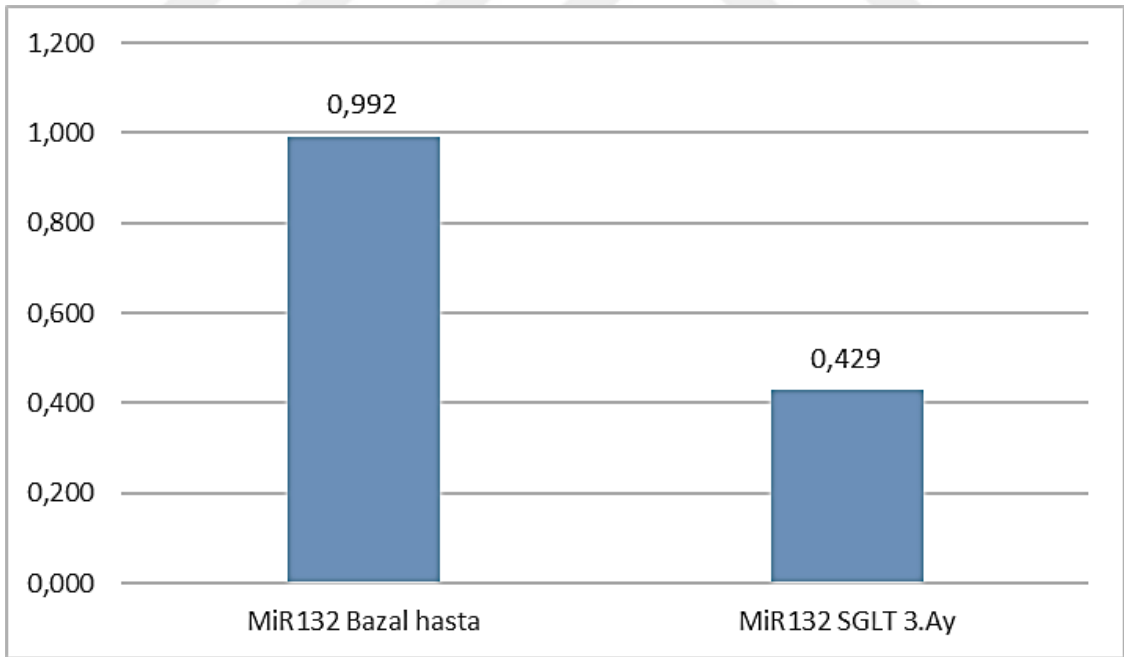
Tablo 4.5. miR-132 düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Sağlıklı gönüllü	SGLT-2 inhibitörü almayan hasta	3 ay süreyle SGLT-2 inhibitörü kullanan hasta	P (Sağlıklı gönüllü-SGLT-2 kullanmayan)	P (SGLT-2 kullanan / SGLT-2 kullanmayan)
miR-132	Ort±S.S 1.3±2	Ort±S.S 0.8±2.6	Ort±S.S 1.4±3.5	0.089 ²	0.421 ¹

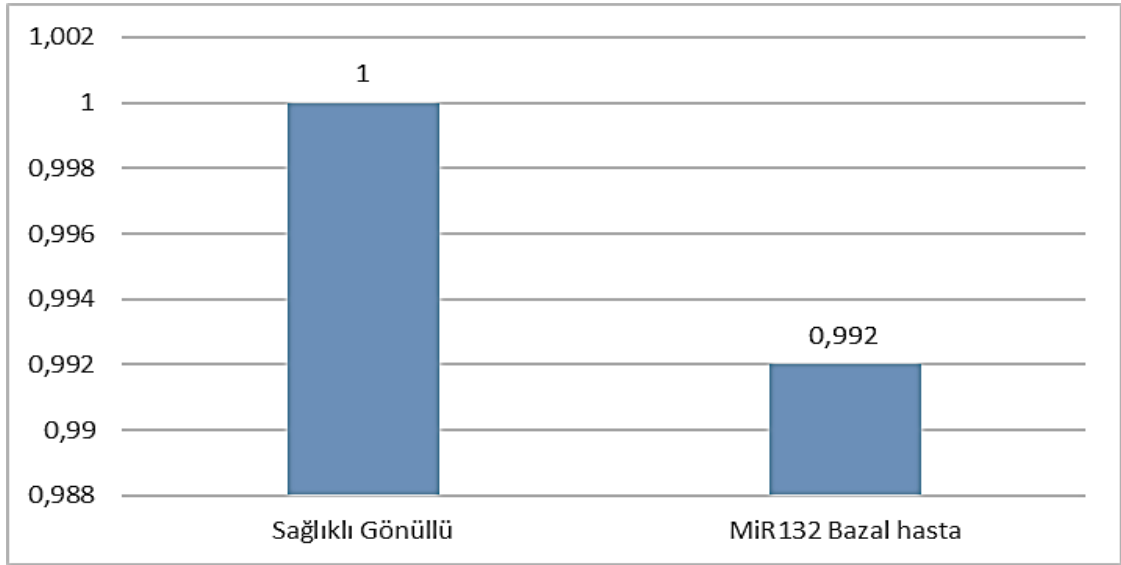
$p < 0,05$, ¹Mann Whitney u test, ²Student t test



Şekil 4.7. miR-132'nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların SGLT-2 kullanımı öncesi ve SGLT-2 kullanım sonrası 3. ay karşılaştırılması



Şekil 4.8. miR-132'nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre SGLT-2 kullanımı sonrası ve öncesi hasta grubunun kendi içinde karşılaştırılması



Şekil 4.9. miR-132'nin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların ilaç kullanımı öncesi bazal değerlerinin karşılaştırılması

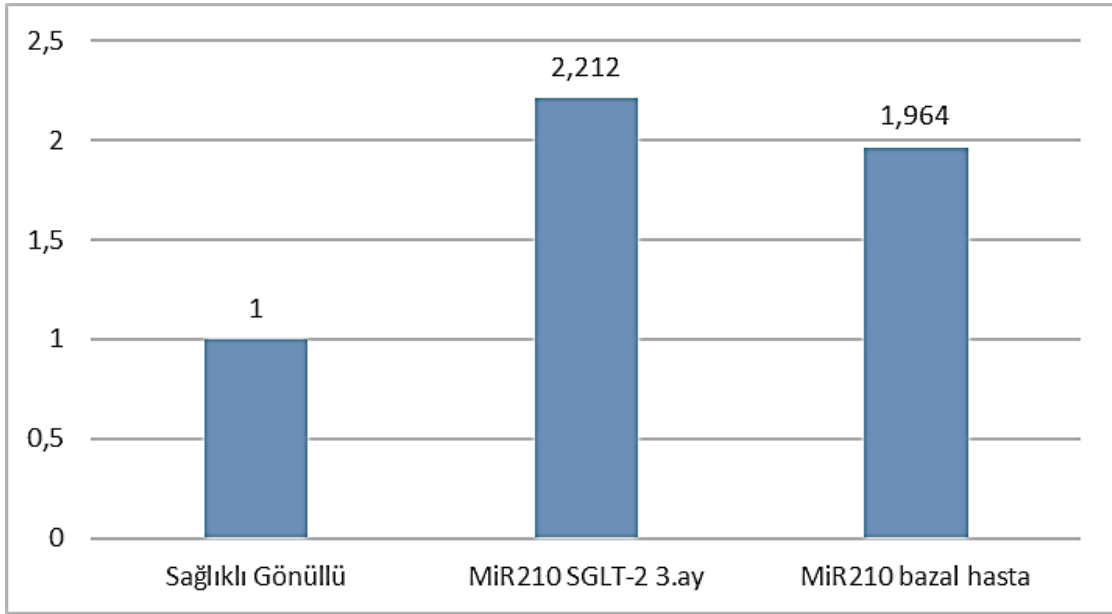
4.4. miR-210'un gruplar arası kıyaslaması

miR-210'un $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre gruplar arası kıyaslaması yapıldığında miR-210 ekspresyonunun sağlıklı gönüllüler ile hasta SGLT-2 inhibitörü almayan kalp yetmezliği hastası bireylerle kıyaslandığında miR-210'un bir kat daha fazla eksprese olduğu, ancak ekspresyon miktarının SGLT-2 inhibitörü kullanımı sonrası hemen hemen aynı kaldığı saptanmıştır. Yapılan istatistiki değerlendirmede miR-210 seviyeleri arasında gerek sağlıklı gönüllü ile SGLT-2 inhibitörü başlanmamış hastalar arasında istatistiksel açıdan fark olmakla beraber, SGLT-2 inhibitörü kullanımı sonrası SGLT-2 inhibitörü kullanan hastaların 3. ay değerleri ile ilaç başlanmamış kalp yetmezliği hastaları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır.

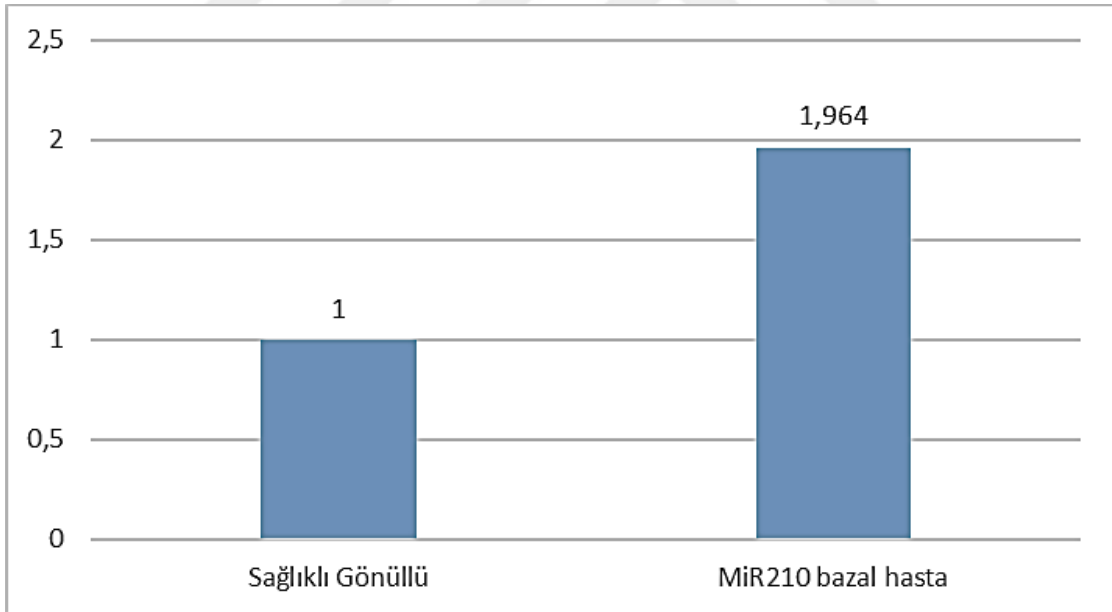
Tablo 4.6. miR-210 düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Sağlıklı gönüllü	SGLT-2 inhibitörü almayan hasta	3 ay süreyle SGLT-2 inhibitörü kullanan hasta	P (Sağlıklı gönüllü-SGLT-2 kullanmayan)	P (SGLT-2 kullanan / SGLT-2 kullanmayan)
miR-210	Ort±S.S 0,4±0,2	Ort±S.S 1.3±3.9	Ort±S.S 2.6±4.5	<0.001 ¹	0.440 ¹

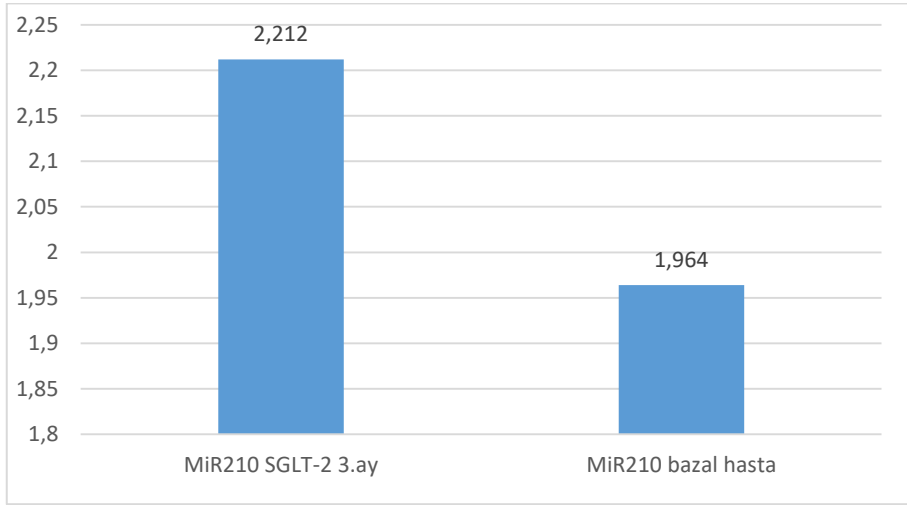
p<0,05, ¹Mann Whitney u test, ²Student t test



Şekil 4.10. miR-210'un $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların SGLT-2 kullanımı öncesi ve SGLT-2 kullanım sonrası 3. ay karşılaştırılması



Şekil 4.11. miR-210'un $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre SGLT-2 kullanımı sonrası ve öncesi hasta grubunun kendi içinde karşılaştırılması



Şekil 4.12. miR-210'un $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanan katlı değişim miktarına göre sağlıklı gönüllüye göre hastaların ilaç kullanımı öncesi bazal değerlerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızın sonuçlarına göre SGLT-2 inhibitörü ilaç kullanımı miR-21 ve miR-499'da istatistiksel olarak anlamlı olarak ekspresyon artışına yol açmış, miR-132 ekspresyonunda anlamlı olmayan bir miktar azalma ve miR-210 ekspresyonunda ise ilaç kullanımı ile değişiklik saptanmamıştır. Bu bulgular SGLT-2 inhibitörlerinin epigenetik etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Kalp yetmezliği tüm dünyada en önemli ölüm sebeplerinden biri olmaya devam etmektedir. Son dönem kalp yetmezliği birçok ileri evre kanserden daha ölümcül seyredabilmektedir. Uzun yıllardır beta bloker ace inhibitörü ve aldosteron reseptör antagonistleri dışında mortalite üzerine etkili ilaç bulunamaması kalp yetmezliği tedavisini standart monoton bir hale getirirken son yıllarda kullanıma giren anjiyotensin reseptörü neprisilin inhibitörü (ARNİ) ajanların ve sonrasında diyabet tedavisi için geliştirilen SGLT-2 inhibitörlerinin kalp yetmezliği tedavisinde mortaliteye olan olumlu etkilerinin gerek DAPA-HF gerekse Emperor-reduced çalışmaları ile gösterilmiş olması tedavi şablonunu betabloker-ARNİ-SGLT-2 inhibitörü haline çevirmiştir. Tüm bu gelişmelere rağmen kalp yetmezliği kötü prognozlu bir hastalık olmaya devam etmektedir ve etkin başka tedavilere ihtiyaç vardır.

SGLT-2 inhibitörlerinin kardiyorenal olumlu etkilerinin tesadüfen bulunması bu moleküllerin etki mekanizmasının nasıl olabileceği sorusunu akla getirmiştir. Birçok mekanizma ortaya atılmış olmakla beraber bu moleküllerin olası epigenetik etkileri üzerine yeterince veri yoktur. İlk olarak dapaglifozinin hipertansif hastalarda yapılan bir çalışmada dapaglifozinin miR-30 ve miR-199 üzerine etki ettiği ve epigenetik etkiye yol açtığı bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada kalp yetmezliği hastaları üzerine yapılmamıştır (39).

Fonksiyonel miRNA üzerine yapılan çalışmalar, çeşitli miRNA'ların kalp yetmezliğine katkıda bulunan patojenik süreçlerde yer aldığını göstermiştir. Bu süreçler yeniden şekillenme, hipertrofi, apoptoz ve hipoksiyi içerir.

Dahası, kalp yetmezliğinin ilerleyişi ışığında, miRNA'ların dinamik ve aşamaya özgü bir davranış sergilediği gösterilmiştir. Transgenik hipertrofik kardiyomiyopati (HCM) fareleri ile yapılan bir çalışmada, miR-1 ve miR-133a gibi miRNA'ların seviyelerinin hastalığın başlangıcından önce azaldığı bulunmuştur. Bununla birlikte, fareler son evre

kalp yetmezliğine doğru ilerledikçe, öncelikle ekspresyon artışı ile karakterize edilen düzensiz bir model sergileyen miRNA'ların sayısında bir artış olmuştur. Önceki çalışmalar, ister iskemik koşullar, ister aort darlığı veya idiyopatik kardiyomiyopati nedeniyle olsun, kalp yetmezliği gelişiminin farklı şekilde üretilen mikroRNA'ların (miRNA'lar) farklı modelleriyle bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, mikroRNA'ların (miRNA'lar) kalp yetmezliğinin başlamasına ve ilerlemesine aktif olarak katkıda bulunduğunu gösteren önemli kanıtlar vardır (40).

miRNA'ların kalp yetmezliği tanısında kullanılıp kullanılamayacağı her zaman merak konusu olmuştur. Akut kalp yetmezliğinde yükselen kimi miRNA'lar kronik stabil hastalarda yüksek olamayabilir. miRNA'ların kalp yetmezliği için biyobelirteç olarak kullanılması ile ilgili çalışmalar miRNA'ların kalp yetmezliği tanısı için kesin sonuç almaktan uzaktır. Bu çalışmalarda miRNA'ların biyobelirteç olarak NT-proBNP ve BNP gibi yerleşik biyobelirteçlerle karşılaştırdığında BNP kadar kalp yetmezliğini ayırt etmede etkin bulunamamışlardır. Çalışmalara alınan hasta sayılarının azlığı farklı materyallerden (tamkan, serum vb.) ölçüm yapılması ve farklı tekniklerle ölçüm yapılması da standardizasyon yapılarak genel bir fikir vermeye olanak sağlamamaktadır. Potansiyel bir alternatif açıklama, bu mikroRNA'ların (miRNA'lar) kardiyomiyositler içindeki yapısal kompleksler içinde potansiyel olarak tutulmuş olabileceği ve böylece salınımlarının engellenebileceğidir. Dolayısıyla serum değerleri kesin bir yargıya varılamamasına neden olabilir (41).

Kalp yetmezliği hastalarında verilen tedavi ile miRNA seviyelerini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Sol ventrikül destek cihazı (LVAD) alan ciddi son dönem kalp yetmezliği olan hastalar, kalp iş yükünde önemli bir azalma yaşarlar. Çalışmalar, miR-483-3p ve miR-1202 seviyelerinde bir artış olduğunu göstermektedir ki bu da tedaviye iyi yanıt verenler ile vermeyenleri birbirinden ayırmaktadır. Ayrıca, miR-208a/208b, miR-499 ve miR-1 gibi dolaşımdaki bazı miRNA'lar LVAD implantasyonundan sonra azalmaktadır. Kardiyak resenkronizasyon tedavisine olumlu yanıt veren hastalarda da miR-30d seviyeleri yüksek bulunmuştur (42,43).

Biz de çalışmamızda modern anlamda kalp yetmezliği tedavisi alan diabetik ejeksiyon fraksiyonu düşük hastalara SGLT-2 inhibitörü kullanımı sonrası miRNA ekspresyonunda değişim olup olmadığına bakarak bu ilaçların olası etkilerinin epigenetik mekanizmaya dayanıp dayanmadığını anlamaya çalıştık.

Çalıştığımız miRNA’lardan miR-499 kalp yetmezliği hastalarında ekspresyon düzeyi düşük olarak saptanırken tedavi ile beraber ekspresyon miktarı 4 kat kadar yükselmiş olarak saptandı. Bu değişiklikler istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.

Çeşitli kardiyak hastalıklarda meydana gelen kardiyak hasar, kardiyomiyositlere özgü miRNA’ların kan dolaşımına önemli ölçüde salınmasına yol açabilir. miR-499’da akut koroner sendromda seviyesi artan bir mikroRNA’dır.

MiR-499’un hipoksi kaynaklı kardiyak hasarı önlediği, oksidatif strese karşı miyokard dokusunu koruduğu, yine mitokondriyal dinamikler üzerine etki ederek antiapoptotik etki oluşturduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Yine miR-499’un doksorubisin kemoterapisinin kardiyotoksik etkisine karşı proteksiyon sağlayabileceği bildirilmiştir. miR-499 ‘un kardiyomiyopatilerde tam tersine bir takım zararlı. Etkileri de olabilmektedir. Hipertofiye olan ventrikülde overeksprese olan miR-499 maladaptasyona yol açarak kalp yetmezliğini hızlandırabilmektedir. Bizim çalışmamızda miR-499 seviyeleri SGLT-2 inhibitörleri ile artış göstermiştir. Diyabetik sistolik kalp yetmezliği hastalarının birçoğunun kalp yetmezliği etyolojisinde iskemik nedenlerin ön planda olduğu düşünülecek olursa miR-499’un artması bu hastalar için olumlu kabul edilebilir. Dolayısıyla SGLT-2 inhibitörlerinin bu hastalarda miR-499 ekspresyonunu arttırması olumlu yönde bir etki olarak kabul edilebilir (44-48).

Bizim çalışmaya dahil ettiğimiz hastalar rutin medikal tedavi alan stabil kalp yetmezliği hastaları idi. Dolayısıyla hastaların bazal miRNA seviyelerini akut kalp yetmezliği atağı, viral miyokardit, akut koroner sendrom gibi miyosit nekrozu ve salınımı olan durumlardaki gibi kardiyak spesifik miRNA’ların yükseldiği durumlarla karıştırmamak gerekir. Zaten çalışmamızda da miR-210 dışında diğer mikrona seviyeleri sağlıklı gönüllülere göre azalmış ya da değişmemiştir. Örneğin miR-499’un akut koroner sendromlarda salınımı artarak kan seviyesi artabilirken stabil kalp yetmezliğinde sabit kalabilmektedir miR-210’un ise kalp yetmezliği için bir biobelirteç olabileceği, BNP ile beraber kullanılabileceği hatta hastanın NYHA(new York Heart Association) sınıfına göre seviyesinin azalıp artabileceği bildirilmiştir. Bu durum bizim çalışmamızda kalp yetmezliği hastalarının SGLT-2 inhibiörü başlanmadan önceki durumda miR-210 seviyelerinin yüksek olması ile uyumludur. Sağlıklı gönüllüler ile kalp yetmezlikli hastaların miRNA seviyelerini kıyaslama açısından bir diğer zorluk ise çalışmaya dahil edilen hastaların zaten kalp yetmezliği nedeniyle birçok ilaç almasıdır Bu ilaçların her

biri sonuç olarak miRNA seviyelerini modifiye edebilir. Dolayısıyla ilaçlarla kompanse stabil vaziyette olan hastalardan alınan örneklerin miRNA seviyelerinin çoğunlukla sağlıklı gönüllüler ile benzer olması yanıltıcı olabilir (49).

Çalışmamızda SGLT-2 inhibitörü kullanımı sonrası ekspresyonu artan diğer bir miRNA ise miR-21 olmuştur. miR-21'in kalp yetmezliğindeki etkisini dual etki olarak yorumlamak yanlış olmaz. Şöyleki; miR-21 bir yandan kardiyak fibroblastlar üzerinden etki ederek fibrozisi aktive ederken diğer yandan apoptozisi inhibe etmekte ve karyomiyositler üzerinden hipertrofik yanıtı arttırabilmektedir miR-21 yine endotel ve düz kas hücrelerinde de bolca bulunur. miR-21'in ekspresyonu, programlanmış hücre ölümü 4 (PDCD4) ve kardiyomiyositlerde Bcl-2 benzeri protein 4 (bax) ve kaspaz-3 gibi apoptozun temel göstergelerinin baskılanmasıyla sonuçlanmıştır miR-21'in koruyucu faydaları kardiyak iskemi-reperfüzyon (IR), diyabetik kardiyomiyopati ve hipertrofik kardiyomiyopatide de gösterilmiştir. MikroRNA miR-21'in özellikle üç anahtar molekülü hedefleyerek kardiyak hasarı azalttığı ve kardiyak miyositlerin hayatta kalmasını artırdığı gözlemlenmiştir: PDCD4, gelsolin ve yaygın olarak tanınan tümör baskılayıcı gen PTEN. Anti-apoptotik etkisine ek olarak miR-21, kardiyomiyopati bağlamında anti-inflamatuar özellikler de sergilemektedir., miR-21 mimiklerinin kullanılmasının insan kardiyomiyositlerinde tümör nekroz faktörü (TNF)- α ile indüklenen apoptoz oluşumunda önemli bir azalmaya yol açtığını göstermiştir (50-54). Bizim çalışmamızda da miR-21 seviyeleri SGLT-2 kullanımı sonrası artış göstermiştir. SGLT-2 inhibitörlerinin yaralı etkilerinin bir kısmı miRNA-21 ekspresyonundaki artıştan kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda miR-132 seviyeleri SGLT-2 inhibitörü kullanımı ile kısmen azalmakla beraber bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. miR-132 ilk defa kalp yetmezliğinde antagonize edilerek insanlarda faz çalışmasında kullanılan bir miRNA olması sebebi ile ilgi çekmektedir. Kalp yetmezliğinde miRNA-132 fibrozisi aktive etmektedir. Kalp yetmezliğinde miR-132/212'deki ekspresyon artışı SERCA-2a'yı hedef alarak kardiyak kontraktıl fonksiyonu bozar. miR-132 ekspresyonunun artması olumsuz yönde kardiyak yeniden şekillenmeyi aktive etmektedir. Dolayısıyla miR-132 inhibisyonu kalp yetmezliği tedavisi için bir hedef olabilir. Çalışmamızda her ne kadar istatistiksel olarak anlamı olmasa da miR-132 ekspresyonunun azalmış olması SGLT-2 inhibitörlerinin olumlu bir etkisi olarak yorumlanabilir. Çalışmamızdaki hasta sayısının azlığı istatistiksel anlamlılık için engel oluşturmuş olabilir (55).

Çalışmamızda miR-210 seviyeleri SGLT-2 inhibitörü kullanımı sonrası anlamlı biçimde değişmemiştir. miR-210 temel anlamda kardiyoprotektif etki gösteren bir miRNA'dır. miR-210, hipoksiye hücrel adaptasyonda çok önemli bir rol oynar, yeni kan damarlarının gelişimini kolaylaştırır ve potansiyel olarak hasardan sonra kardiyak iyileşmeye yardımcı olur. Ayrıca kardiyak hücre ölümünün, özellikle kardiyomiyositlerde apoptozun azaltılmasında rol oynar ve bu da kardiyak hasarın etkisini azaltabilir. Ek olarak, miR-210 kardiyak fibrozisin, özellikle de kalp dokusunda skar oluşumunun önlenmesine yardımcı olarak kardiyak fonksiyonun korunmasına katkıda bulunabilir (56).

Çalışmamızın kısıtlılıkları hasta sayısının azlığı, hastaların halihazırda birçok ilaç kullanıyor olması, ülkemizdeki ilaç geri ödeme mevzuatı nedeniyle çalışmaya sadece diyabeti olan kalp yetmezlikli hastaların dahil edilmesi sayılabilir. Daha fazla sayıda hastanın ve daha çok çeşitli miRNA'ların çalışılacağı araştırmalar kalp yetmezliği tedavisindeki etkiyi daha iyi ortaya çıkarabilir.

Kalp yetmezliği tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Kalp yetmezliği tedavisinde kullanılacak yöntemlerin çeşitlilik kazanması etyolojisi multifaktöriyel olan kalp yetmezliği tedavisini kolaylaştırabilir. SGLT-2 inhibitörleri son zamanlarda kalp yetmezliği tedavisinde yeni bir umut olmuştur. SGLT-2 inhibitörlerinin tesadüfen kalp yetmezliği tedavisinde etkin olduğunun bulunması bu ilaçların etki mekanizması hakkında merak ve araştırmaların artmasıyla sonuçlanmıştır. SGLT-2 inhibitörlerinin olası etki mekanizmalarından biri de epigenetik mekanizmalardır. Çalışmamızda bu ilaçların zaman içerisinde birtakım miRNA'ların (miR-132, miR-21) ekspresyonunu değiştirdiği saptanmıştır. Bu tip etkilerin daha iyi ortaya konulması için daha büyük çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- 1- Bozkurt B, Coats AJS, Tsutsui H, Abdelhamid CM, Adamopoulos S, Albert N, Anker SD, Atherton J, Bohm M, Butler J, Drazner MH, Michael Felker G, Filippatos G, Fiuzat M, Fonarow GC, Gomez-Mesa JE, Heidenreich P, Imamura T, Jankowska EA, Januzzi J, Khazanie P, Kinugawa K, Lam CSP, Matsue Y, Metra M, Ohtani T, Francesco Piepoli M, Ponikowski P, Rosano GMC, Sakata Y, Seferovic P, Starling RC, Teerlink JR, Vardeny O, Yamamoto K, Yancy C, Zhang J, Zieroth S. Universal definition and classification of heart failure: a report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure: Endorsed by the Canadian Heart Failure Society, Heart Failure Association of India, Cardiac Society of Australia and New Zealand, and Chinese Heart Failure Association. *Eur J Heart Fail* 2021;23:352-380.
- 2-Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, Hoes AW. *Eur J Heart Fail.* Epidemiology of heart failure.2020;1342-1356. doi: 10.1002/ehf.1858. Epub 2020 Jun 1.
- 3- Değertekin M, Erol C, Ergene O, Tokgözoğlu L, Aksoy M, Erol MK, Eren M, Sahin M, Eroğlu E, Mutlu B, Kozan O. *Türk Kardiyol Dern Ars.* 2012 Jun;40:298-308. doi: 10.5543/tkda.2012.65031.
- 4- McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJV, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Kathrine Skibellund A; ESC Scientific Document Group. *Eur Heart J.*, 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. 2021;42:3599-3726. doi: 10.1093/eurheartj/ehab368.
5. Westerhof N, O'Rourke MF. Haemodynamic basis for the development of left ventricular failure in systolic hypertension and for its logical therapy. *J Hypertens* 1995;13:943–52
6. Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE. Left ventricular remodeling in heart failure: Current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging* 4: 98-108, 2011
7. Hartupee J, Mann DL. *Nat Rev Cardiol.* Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. 2017 Jan;14:30-38
8. Edit Tanai, Stefan Frantz *Pathophysiology of Heart Failure, Compr Physiol* 2015; 6:187-214.
9. Kevin S Shah, Haolin Xu, Roland A Matsouaka, Deepak L Bhatt, Paul A Heidenreich, Adrian F Hernandez, Adam D Devore, Clyde W Yancy, Gregg C Fonarow *Heart Failure With Preserved, Borderline, and Reduced Ejection Fraction: 5-Year Outcomes. J Am Coll Cardiol.* 2017 Nov 14;70:2476-2486

10. Talha KM, Anker SD, Butler SGLT-2 Inhibitors in Heart Failure: A Review of Current Evidence. *J. Int J Heart Fail.* 2023 Mar 13;5:82-90
11. Dachi T, Yasuda K, Okamoto Y, et al. T-1095, a renal Na⁺-glucose transporter inhibitor, improves hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 2000;49:990-5
12. Fitchett D, Inzucchi SE, Cannon CP, McGuire DK, Scirica BM, Johansen OE, Sambeviski S, Kaspers S, Pfarr E, George JT, Zinman B Empagliflozin Reduced Mortality and Hospitalization for Heart Failure Across the Spectrum of Cardiovascular Risk in the EMPA-REG OUTCOME Trial. *Circulation.* 2019 Mar 12;139:1384-1395
13. Stephen D Wiviott¹, Itamar Raz¹, Marc P Bonaca¹, Ofri Mosenzon¹, Eri T Kato¹, Avivit Cahn¹, Michael G Silverman¹, Thomas A Zelniker¹, Julia F Kuder¹, Sabina A Murphy¹, Deepak L Bhatt¹, Lawrence A Leiter¹, Darren K McGuire¹, John P H Wilding¹, Christian T Ruff¹, Ingrid A M Gause-Nilsson¹, Martin Fredriksson¹, Peter A Johansson¹, Anna-Maria Langkilde¹, Marc S Sabatine Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes *N Engl J Med* 2019 Jan 24;380(4):347-357.) (Bruce Neal¹, Vlado Perkovic¹, Kenneth W Mahaffey¹, Dick de Zeeuw¹, Greg Fulcher¹, Ngozi Erondur¹, Wayne Shaw¹, Gordon Law¹, Mehul Desai¹, David R Matthews¹; Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes *N Engl J Med* 2017 Aug 17;377:644-657.
14. John J V McMurray¹, Scott D Solomon¹, Silvio E Inzucchi¹, Lars Køber¹, Mikhail N Kosiborod¹, Felipe A Martinez¹, Piotr Ponikowski¹, Marc S Sabatine¹, Inder S Anand¹, Jan Bělohávek¹, Michael Böhm¹, Chern-En Chiang¹, Vijay K Chopra¹, Rudolf A de Boer¹, Akshay S Desai¹, miRta Diez¹, Jaroslaw Drozd¹, Andrej Dukát¹, Junbo Ge¹, Jonathan G Howlett¹, Tzvetana Katova¹, Masafumi Kitakaze¹, Charlotta E A Ljungman¹, Béla Merkely¹, Jose C Nicolau¹, Eileen O'Meara¹, Mark C Petrie¹, Pham N Vinh¹, Morten Schou¹, Sergey Tereshchenko¹, Subodh Verma¹, Claes Held¹, David L DeMets¹, Kieran F Docherty¹, Pardeep S Jhund¹, Olof Bengtsson¹, Mikaela Sjöstrand¹, Anna-Maria Langkilde¹; Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction *N Engl J Med* 2019 Nov 21;381:1995-2008
15. Milton Packer¹, Stefan D Anker¹, Javed Butler¹, Gerasimos Filippatos¹, Stuart J Pocock¹, Peter Carson¹, James Januzzi¹, Subodh Verma¹, Hiroyuki Tsutsui¹, Martina Brueckmann¹, Waheed Jamal¹, Karen Kimura¹, Janet Schnee¹, Cordula Zeller¹, Daniel Cotton¹, Edimar Bocchi¹, Michael Böhm¹, Dong-Ju Choi¹, Vijay Chopra¹, Eduardo Chuquiure¹, Nadia Giannetti¹, Stefan Janssens¹, Jian Zhang¹, Jose R Gonzalez Juanatey¹, Sanjay Kaul¹, Hans-Peter Brunner-La Rocca¹, Bela Merkely¹, Stephen J Nicholls¹, Sergio Perrone¹, Ileana Pina¹, Piotr Ponikowski¹, Naveed Sattar¹, Michele Senni¹, Marie-France Seronde¹, Jindrich Spinar¹, Iain Squire¹, Stefano Taddei¹, Christoph Wanner¹, Faiez Zannad¹; Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure *N Engl J Med* 2020 Oct 8;383:1413-1424.
16. Martin R Cowie, Miles Fisher SGLT-2 inhibitors: mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control *Nat Rev Cardiol* 2020 Dec;17:761-772.

17. Güzelgül F., Aksoy K. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, cilt.24, sa.4, ss.472-493, 2014
18. Peter J Kennel , P Christian Schulze A Review on the Evolving Roles of miRNA-Based Technologies in Diagnosing and Treating Heart Failure Cell2021 Nov 16;10:3191
19. Maria I Almeida , Rui M Reis, George A Calin MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers Mutat Res 2011 Dec 1;717:1-8.
20. R C Lee , R L Feinbaum, V Ambros The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 Cell 1993 Dec 3;75:843-54.
21. B Wightman, I Ha, G Ruvkun Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. Elegans Cell1993 Dec 3;75:855-62
22. Rosalind Lee , Rhonda Feinbaum, Victor Ambros A short history of a short RNA Cell 2004 Jan 23;116
23. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004 Jan 23;116:281-97
24. Alles, J.; Fehlmann, T.; Fischer, U.; Backes, C.; Galata, V.; Minet, M.; Hart, M.; Abu-Halima, M.; Grässer, F.A.; Grässer, G.; et al. An estimate of the total number of true human miRNAs. Nucleic Acids Res. 2019, 47, 3353–3364
25. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing Yoontae Lee , Chiyoung Ahn, Jinju Han, Hyounjeong Choi, Jaekwang Kim, Jeongbin Yim, Junho Lee, Patrick Provost, Olof Rådmark, Sunyoung Kim, V Narry Kim The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing Nature 2003 Sep 25;425:415-9
26. G Hutvagner , J McLachlan, A E Pasquinelli, E Bálint, T Tuschl, P D Zamore A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA Science 2001 Aug 3;293:834-8
27. Ahmet M Denli , Bastiaan B J Tops, Ronald H A Plasterk, René F Ketting, Gregory J Hannon Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex Nature 2004 Nov 11;432:231-5
28. Chong, M. M., Zhang, G., Cheloufi, S., Neubert, T. A., Hannon, G. J., & Littman, D. R.. Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. Genes & development, 2010; 24, 1951-1960.
29. Jörg Täubel , Wilfried Hauke , Steffen Rump , Janika Viereck , Sandor Batkai , Jenny Poetzsch , Laura Rode , Henning Weigt , Celina Genschel , Ulrike Lorch , Novel antisense therapy targeting microRNA-132 in patients with heart failure: results of a first-in-human Phase 1b randomized, double-blind, placebo-controlled study Eur Heart J 2021 Jan 7;42:178-188.

30. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Dec;3:499-506.
31. Scot J Matkovich, Yuanxin Hu, William H Eschenbacher, Lisa E Dorn, Gerald W Dorn 2nd Direct and indirect involvement of microRNA-499 in clinical and experimental cardiomyopathy *Circ Res* 2012 Aug 17;111:521-31
32. Beibei Dai, Feng Wang Xiang Nie, Hengzhi Du, Yanru Zhao Zhongwei Yin, Huaping Li, Jiahui Fan, Zheng Wen, Dao Wen Wang, Chen Chen The Cell Type-Specific Functions of miR-21 in Cardiovascular Diseases *Front Genet* 2020 Nov 20;11:563166
33. Cheng Y, Zhang C.J MicroRNA-21 in Cardiovascular Disease *Cardiovasc Transl Res*. 2010 Jun;3:251-5.
34. Dongchao Lu, Thomas Thum RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease *Nat Rev Cardiol* 2019 Nov;16:661-674.
35. Ariana Foinquinos^{#1}, Sandor Batkai^{#1,2}, Celina Genschel^{1,2}, Janika Viereck^{1,2}, Steffen Rump², Mariann Gyöngyösi³, Denise Traxler³, Martin Riesenhuber³, Andreas Spannauer³, Dominika Lukovic³, Natalie Weber⁴, Katrin Zlabinger³, Ena Hašimbegović³, Johannes Winkler³, Jan Fiedler¹, Seema Dangwal¹, Martin Fischer⁵, Jeanne de la Roche⁵, Daniel Wojciechowski⁵, Theresia Kraft⁴, Rita Garamvölgyi⁶, Sonja Neitzel⁷, Shambhabi Chatterjee¹, Xiaoke Yin⁸, Christian Bär¹, Manuel Mayr⁸, Ke Xiao¹, Thomas Thum^{9,10,11}, Preclinical development of a miR-132 inhibitor for heart failure treatment *Nat Commun* 2020 Jan 31;11:633
36. Shashi Kumar Gupta, Ankita Garg, Petros Avramopoulos, Stefan Engelhardt, Katrin Streckfuss-Bömeke, Sandor Batkai, Thomas Thum^{miR}-212/132 Cluster Modulation Prevents Doxorubicin-Mediated Atrophy and Cardiotoxicity *Mol Ther* 2019 Jan 2;27:17-28
37. Guan Y, Song X, Sun W, Wang Y, Liu B. Effect of Hypoxia-Induced MicroRNA-210 Expression on Cardiovascular Disease and the Underlying Mechanism. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 May 21;2019:4727283
38. Endo K, Naito Y, Ji X, Nakanishi M, Noguchi T, Goto Y, Nonogi H, Ma X, Weng H, Hirokawa G, Asada T, Kakinoki S, Yamaoka T, Fukushima Y, Iwai N. MicroRNA 210 as a biomarker for congestive heart failure *Biol Pharm Bull*. 2013;36:48-54
39. Anna Solini¹, Marta Seghieri², Livia Giannini², Edoardo Biancalana², Federico Parolini², Chiara Rossi¹, Angela Dardano², Stefano Taddei², Lorenzo Ghiadoni², Rosa Maria Bruno², The Effects of Dapagliflozin on Systemic and Renal Vascular Function Display an Epigenetic Signature *J Clin Endocrinol Metab* 2019 Oct 1;104:4253-4263.
40. Vegter EL, van der Meer P, de Windt LJ, Pinto YM, Voors AA MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy. *Eur J Heart Fail*. 2016 May;18:457-68

41. Katrina L Ellis¹, Vicky A Cameron, Richard W Troughton, Chris M Frampton, Leigh J Ellmers, A Mark Richards Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients *Eur J Heart Fail* 2013 Oct;15:1138-47.
42. Melman YF, Shah R, Danielson K, Xiao J, Simonson B, Barth A, Chakir K, Lavender Z, Lewis GD, Truong QA, Kleber A, Das R, Rosenzweig A, Wang Y, Kass D, Singh JP, Das S. Circulating MicroRNA-30d is associated with response to cardiac resynchronization therapy in heart failure and regulates cardiomyocyte apoptosis: a translational pilot study. *Circulation* 2015;131:2202–2216.
43. Akat KM, Moore-McGriff D, Morozov P, Brown M, Gogakos T, Correa Da Rosa J, Mihailovic A, Sauer M, Ji R, Ramarathnam A, Totary-Jain H, Williams Z, Tuschl T, Schulze PC. Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:11151–11156.
44. Yujie Shi¹, Yunfeng Han², Lili Niu², Junxia Li², Yundai Chen³ miR-499 inhibited hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes injury by targeting SOX6 *Biotechnol Lett* 2019 Jul;41:837-847
45. Scot J Matkovich¹, Yuanxin Hu, William H Eschenbacher, Lisa E Dorn, Gerald W Dorn 2nd Direct and indirect involvement of microRNA-499 in clinical and experimental cardiomyopathy *Circ Res* 2012 Aug 17;111:521-31
46. Wang JX, Zhang XJ, Li Q, Wang K, Wang Y, Jiao JQ, Feng C, Teng S, Zhou LY, Gong Y, Zhou ZX, Liu J, Wang JL, Li PF. MicroRNA-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med.* 2011 Jan;17:71-8.
47. Wang J, Jia Z, Zhang C, Sun M, Wang W, Chen P, Ma K, Zhang Y, Li X, Zhou C. miR-499 protects cardiomyocytes from H2O2-induced apoptosis via its effects on Pdc4 and Pacs2. *RNA Biol.* 2014 Mar;11:339-50.
48. Wan Q, Xu T, Ding W, Zhang X, Ji X, Yu T, Yu W, Lin Z, miR-499-5p Attenuates Mitochondrial Fission and Cell Apoptosis via p21 in Doxorubicin Cardiotoxicity. Wang J. *Front Genet.* 2019 Jan 21;9:734.
49. Endo K, Naito Y, Ji X, Nakanishi M, Noguchi T, Goto Y, Nonogi H, Ma X, Weng H, Hirokawa G, Asada T, Kakinoki S, Yamaoka T, Fukushima T. MicroRNA 210 as a biomarker for congestive heart failure. Wang J. *Front Genet.* 2019 Jan 21;9:734
50. Gu GL, Xu XL, Sun XT, Zhang J, Guo CF, Wang CS, et al. Cardioprotective effect of MicroRNA-21 in murine myocardial infarction. *Cardiovasc Ther.* 2015;33:109–17. doi: 10.1111/1755-5922.12118
51. Tu Y, Wan L, Fan Y, Wang K, Bu L, Huang T, et al. Ischemic postconditioning-mediated miRNA-21 protects against cardiac ischemia/reperfusion injury via PTEN/Akt pathway. *PLoS ONE.* 2013;8:e75872. doi: 10.1371/journal.pone.0075872
52. Gu H, Liu Z, Li Y, Xie Y, Yao J, Zhu Y, et al. Serum-derived extracellular vesicles protect against acute myocardial infarction by regulating miR-21/PDCD4 signaling pathway. *Front Physiol.* 2018; 9:348. doi: 10.3389/fphys.2018.00348

- 53.Dai B, Li H, Fan J, Zhao Y, Yin Z, Nie X, et al. miR-21protected against diabetic cardiomyopathy induced diastolic dysfunction by targeting gelsolin. *Cardiovasc Diabetol.* 2018; 17:123. doi: 10.1186/s12933-018-0767-z
- 54.Surina S, Fontanella RA, Scisciola L, Marfella R, Paolisso G, Barbieri miR-21in Human Cardiomyopathies. *M.Front Cardiovasc Med.* 2021 Oct 27;8:767064
- 55.Zhiyong Lei,^{1,2} Christine Wahlquist,³ Hamid el Azzouzi,¹ Janine C. Deddens,¹ Diederik Kuster,⁴ Alain van Mil,^{1,5} Agustin Rojas-Munoz,³ Manon M. Huibers,⁶ Mark Mercola,³ Roel de Weger,⁶ Jolanda Van der Velden,⁴ Junjie Xiao,^{7,8} Pieter A. Doevendans,^{1,9,10} and Joost P. G. Sluijter^{1,5,*} miR-132/212 Impairs Cardiomyocytes Contractility in the Failing Heart by Suppressing SERCA2a *Front Cardiovasc Med.* 2021; 8: 592362.
- 56.Guan Y, Song X, Sun W, Wang Y, Liu B. Effect of Hypoxia-Induced MicroRNA-210 Expression on Cardiovascular Disease and the Underlying Mechanism. *Oxid Med Cell Longev.* 2019.



EK-1



GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Düşük Ejeksiyon Fraksiyonlu Kalp Yetmezliği (LVEF <%40) olan Diyabetik Hastalarda SGLT-2 inhibitörü ilaçların epigenetik etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2021/355

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Araştırma Merkezi Binası (GAÜNDAM)
	TELEFON	
	FAKS	-
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Sibel Oğuzkan BALCI
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji A.B.D
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	
	DESTEKLEYİCİ	
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐
		FAZ 2 ☐
		FAZ 3 ☐
		FAZ 4 ☐
		Gözlemsel ilaç çalışması ☐
		Tıbbi cihaz klinik araştırması ☐
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları ☐
		İlaç dışı klinik araştırma ☒
	Diğer ise belirtiniz :	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐ ULUSAL ☒ ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☐		

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr. Yasemin ZER

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Düşük Ejeksiyon Fraksiyonlu Kalp Yetmezliği (LVEF <%40) olan Diyabetik Hastalarda SGLT-2 inhibitörü ilaçların epigenetik etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2021/355
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2021/355
	Tarih: 07.02.2022
Sorumlu Araştırmacı Prof. Dr. Sibel Oğuzkan BALCI olan "Düşük Ejeksiyon Fraksiyonlu Kalp Yetmezliği (LVEF <%40) olan Diyabetik Hastalarda SGLT-2 inhibitörü ilaçların epigenetik etkisi" başlıklı proje öneri dosyası ile ilgili belgeler incelenmiş olup, etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Yasemin ZER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Yasemin ZER	Tıbbi Mikrobiyoloji	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr.Muradiye NACAK	Tıbbi Farmakoloji	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr.Seval KUL	Biyoistatistik	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr.Osman BAŞPINAR	Çocuk Kardiyoloji	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr.Suzan TABUR	Endokrinoloji ve Metabolizma	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr.Beltin DEMİRCİOĞLU KILIÇ	Çocuk Nefroloji	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr.Nurgül ÖZDEMİR	Psikiyatri Hemşireliği	Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr. İlhan BAHŞİ	Anatomi	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr.Fatih SARI	Protetik Diş Tedavisi	Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr. Şengül ŞAHİN	Psikiyatri	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Burak YAMAN	Fizyoloji	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Uzm.Dr.Melih HANGÜL	Pediyatrik Göğüs Hastalıkları	Gaziantep Cengiz Gökçek Kadın Doğum ve Çocuk Hastanesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Emine Aybiken YILDIRIM	Hukukçu	Gaziantep Barosu	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Zeki EKİNCİ	Şahinbey Belediye Başkan Yardımcısı	Şahinbey Belediyesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	

*Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Yasemin ZER

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

