

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



Granülomatöz Lezyonla Seyreden Sarkoidoz ve Tüberkülozun
Ayırıcı Tanısında miRNA'ların Rolü

Uzmanlık Tezi
Dr. Aygun Garayeva

Danışman
Prof. Dr. Mustafa Erelel

İSTANBUL, 2023

ÖNSÖZ

Eğitimimde bilgi, beceri ve fikirleri ile büyük katkısı olan, sürekli bana destek veren, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım saygıdeğer tez hocam sayın Prof. Dr. Mustafa Erelel'e;

Tezimle ilgili her konuda destek ve önerilerini esirgemeyen Prof. Dr. Halim İşsever'e; Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğr. Gör. Dr. Gözde Öztan'a; Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümünden Prof. Dr. Kazım Yalçın ARĞA'ya;

Bana tıpta uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve beceri birikimimi sağlayan ;

Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülfer Okumuş, Prof. Dr. Orhan Arseven, Prof. Dr. Zeki Kılıçaslan, Prof. Dr. Tülin Çağatay, Prof. Dr. Ziya Gülbaran, Prof. Dr. Turhan Ece, Prof. Dr. Esen Kıyan, Prof. Dr. Züleyha Bingöl, Doç. Dr. Aylin Pıhtılı'ya,

Beraber çalıştığım tüm değerli asistan arkadaşlarıma, özellikle Könül Mammadova ve Qüdrat Badalov'a;

Sonsuz desteklerinden dolayı , tüm aile büyüklerime;

Uzmanlık eğitimim boyunca bana destek olan eşime ve çocuklarıma;

Her koşulda destekçim olan değerli kardeşlerime;

Üniversite çalışanlarına ve tüm Türkiye'ye;

Tek tek minnettarlığımı, teşekkürlerimi, saygılarımı ve sevgilerimi sunarım.

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ailesinin bir parçası olmak onurunu hayatımın geri kalan döneminde de kalbimde taşıyacağım.

Dr. Aygün Garayeva

İstanbul, 2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR.....	III
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT	IX
I. GİRİŞ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
1. Tüberküloz.....	3
A. Tanım.....	3
B. Enfeksiyon	3
C. Patogenez.....	5
2. Sarkoidoz	6
A. Tanım.....	6
B. Patogenez.....	7
3. MikroRNA (miRNA)'lar ve özellikleri	9
4. Tüberküloz Patogenezinde miRNA'lar	11
5. Sarkoidoz Patogenezinde miRNA'lar	13
III. GEREÇ ve YÖNTEM	16
1. miRNeasy Serum/ Plasma Advanced Kit ile RNA izolasyonu	16
2. cDNA Sentezi	17
3. RT-PCR (Ters transkripsiyon reaksiyonu)	17
4. İstatistiksel Analiz	19
IV. BULGULAR.....	21
1. Sarkoidoz Roc Analiz Sonuçları.....	29
A. Hsa-miR-22-3p referans geni için cut-off değerleri	29
B. Hsa-miR-93-5p referans geni için cut-off değerleri	32
2. Tüberküloz Roc Analiz Sonuçları	34
A. Hsa-miR-22-3p referans geni için cut-off değerleri	34
B. Hsa-miR-93-5p referans geni için cut-off değerleri	36
V. TARTIŞMA	43
VI. KAYNAKLAR	49

KISALTMALAR

AIDS	: Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
EBUS	: Endobronşiyal Ultrasonografi
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
DC	: Dendritik hücreleri
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
IFN	: İnterferon
LTBI	: Latent tüberküloz enfeksiyonu
M. africanum	: Mycobacterium africanum
M. bovis	: Mycobacterium bovis
M. canettii	: Mycobacterium canettii
M. caprae	: Mycobacterium caprae
M. microti	: Mycobacterium microti
M. pinnipedii	: Mycobacterium pinnipedii
miRNA	: Mikro RNA
MTB	: Mycobacterium tuberculosis
MTBK	: Mycobacterium tuberculosis kompleksi
NK	: Doğal öldürücü
PACT	: protein kinaz R'nin protein aktivatörü
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
TB	: Tüberküloz
Th1	: T yardımcı hücre 1
TRBP	: Trans-aktivasyon yanıtı RNA-bağlayıcı protein
Treg	: T Düzenleyici Hücreler
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Tanı anında organların genel olarak etkilenme sıklığı*	7
Tablo 2. Her bir RNA örneği için cDNA sentez mix protokolü.	17
Tablo 3. Ters transkripsiyon reaksiyonu sıcaklık döngü koşulları.....	17
Tablo 4. PCR reaksiyon mix protokolü.....	18
Tablo 5. PCR döngü koşulları.	18
Tablo 6. Tanı testini değerlendirirken karşılaşılabilecek durumlar.....	19
Tablo 7. Tüberküloz hasta bilgileri	21
Tablo 8. Sarkoidoz hasta bilgileri	22
Tablo 9. Kontrol bilgileri	23
Tablo 10. Çalışma kapsamına alınan kişilerin yaş gruplarına göre dağılımları	23
Tablo 11. Çalışma kapsamına alınan kişilerin cinsiyete göre dağılımları.....	24
Tablo 12. Tüberküloz hastalarının Ct değerleri	24
Tablo 13. Sarkoidoz hastalarının Ct değerleri.....	25
Tablo 14. Sağlıklı kontrollerin Ct değerleri	25
Tablo 15. Çalışma kapsamına alınan kişilere ait ölçülen mi RNA değerlerinin dağılımları ...	26
Tablo 16. hsa-miR-22-3p housekeeping referans genine göre TBC ve kontrol grubunda Δ Ct değerleri	26
Tablo 17. hsa-miR-93-5p housekeeping referans genine göre TBC ve kontrol grubunda Δ Ct değerleri	27
Tablo 18. hsa-miR-22-3p housekeeping referans genine göre sarkoidoz ve kontrol grubunda Δ Ct değerleri.....	27
Tablo 19. hsa-miR-93-5p housekeeping referans genine göre sarkoidoz ve kontrol grubunda Δ Ct değerleri.....	28
Tablo 20. Eğri altında kalan alan değerleri ve anlamlılıkları	29
Tablo 21. Optimal cut-off değerleri	30
Tablo 22. Eğri altında kalan alan değerleri ve anlamlılıkları	32
Tablo 23. Optimal cut-off değerleri	32
Tablo 24. Eğri altında kalan değerler	34
Tablo 25. Δ Ct Hsa-miR-26b-5p ve Δ Ct Hsa-miR-568 değerlerine göre sensitivite ve spesifisite değerleri	35

Tablo 26. Eğri altında kalan değerleri	36
Tablo 27. Hsa -miR-26b-5p ve hsa-miR-568 Δ Ct değerlerine göre sensitivite ve spesifisite değerleri	37
Tablo 28. Mienturnet Zenginleştirme sonuçları (miRTarBase üzerinden)	41
Tablo 29. MIENTURNET Zenginleştirme sonuçları (miRTarBase üzerinden)	42
Tablo 30. Sarkoidoz hastalarında miRNA'lar üzerinden tanı yüzdeleri	48
Tablo 31. Tüberküloz hastalarında miRNA'lar üzerinden tanı yüzdeleri	48



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: Verem (TB) spektrumu - Mycobacterium tuberculosis enfeksiyonundan aktif (akciğer) TB hastalığına kadar.	4
Şekil 2. Aktif Tüberkülozun Patofizyolojisinde Yedi Adım.....	5
Şekil 3. Sarkoidozun Patolojisi ve Mevcut Tedavi Yaklaşımları	8
Şekil 4. MikroRNA (miRNA) biyogenezini ve aktivitesini kontrol eden moleküler mekanizmalar.	10
Şekil 5. Mycobacterium tuberculosis (Mtb) immün kaçış mekanizmalarında yer alan miRNA'lar	12
Şekil 6. T hücresi gelişiminin ve fonksiyonunun mikroRNA aracılı düzenlemesi- sarkoidoz patogenezinde miRNA'ların olası katılımını gösteren bir akış şeması	14
Şekil 7. Akciğerlerde meydana gelen patolojik süreçlerde yer alan deregüle edilmiş miRNA sınıfları. Kısaltmalar: miR — microRNA, ↓azalan ifade, ↑ artan ifade.....	15
Şekil 8. ROC eğrisi (Sarkoidozda değerlerin daha düşük olması nedeniyle referans değerleri kontrole göre alınmıştır. Referans kontrol grubu alınmıştır).	29
Şekil 9. ROC eğrisi (Referans kontrol grubu olarak alınmıştır).	32
Şekil 10. ROC eğrisi (referans olarak Hsa-miR-22-3p alınmıştır)	34
Şekil 11. ROC eğrisi (referans olarak hsa-miR-93-5p alınmıştır)	36
Şekil 12. miR-93-5p'e housekeeping referans genine göre Tüberküloz, Sarkoidoz hasta grupları ve kontrol grubunda miR-375 ekspresyon düzeylerinin boxplot diyagramıyla gösterimi.....	38
Şekil 13. miR-93-5p'e housekeeping referans genine göre Tüberküloz, Sarkoidoz hasta grupları ve kontrol grubunda miR-568 ekspresyon düzeylerinin boxplot diyagramıyla gösterimi.....	39
Şekil 14. miR-22-3p housekeeping referans genine göre Tüberküloz, Sarkoidoz hasta grupları ve kontrol grubunda miR-375 ekspresyon düzeylerinin boxplot diyagramıyla gösterimi.....	39
Şekil 15. miR-22-3p housekeeping referans genine göre Tüberküloz, Sarkoidoz hasta grupları ve kontrol grubunda miR- 568 ekspresyon düzeylerinin boxplot diyagramıyla gösterimi.....	40
Şekil 16. miRNA-hedef zenginleştirme analizi sonucu	41
Şekil 17. miRNA-hedef zenginleştirme analizi sonucu	42

ÖZET

**Granülatöz Lezyonla Seyreden Sarkoidoz ve Tüberkülozun Ayırıcı Tanısında
miRNA'ların Rolü**

Amaç: Sarkoidozlu ve tüberkülozlu bireylerin kan plazmalarındaki miRNA anlatım düzeylerini belirlemek için biyoinformatik analizlerle tespit edilen 10 miRNA ve 2 referans miRNA üzerinden qRT-PCR yöntemini kullanarak sarkoidoz ve tüberkülozun ayırıcı tanısında miRNA'ların potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılması amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntemler: 2021-2022 tarihleri arasında, İstanbul Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim dalına başvuran hastalar öğretim üyesi ve tıpta uzmanlık öğrencisi ile beraber tanısal doğruluk açısından değerlendirildikten ve hasta onam formları alındıktan sonra kan örnekleri alındı.

Biyoinformatik analizlerle tespit edilen 10 miRNA'nın (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-1273e, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-3622b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, hsa-miR-9-5) ve 2 referans miRNA'nın (hsa-miR-22-3p ve hsa-miR-93-5p) sarkoidoz ve tüberküloz ayırıcı tanısında değerini araştırmak için sarkoidozlu ve tüberkülozlu bireylerin kan plazma örneklerinin anlatım düzeyleri qRT-PZR yöntemi ile belirlendi. (Etik Kurul Dosya No: 2021/364086)

Bulgular: Çalışmaya 18 TBC, 15 Sarkoidoz ve 20 kişilik kontrol grubu dahil edildi. hsa-miR-22-3p housekeeping referans genine göre TBC ve kontrol grubunda ΔC_t değerleri; hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-568'de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). hsa-miR-22-3p housekeeping referans genine göre sarkoidoz ve kontrol grubunda ΔC_t değerleri; hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 ve hsa-miR-9-5p'de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). hsa-miR-93-5p housekeeping referans genine göre sarkoidoz ve kontrol grubunda ΔC_t değerleri hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 ve hsa-miR-9-5p'de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,005$). Hsa-miR-93-5p housekeeping referans genine göre sarkoidoz ve kontrol grubunda ΔC_t değerleri; hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568'de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Çalışmamızda qRT-PCR yöntemiyle yapılan analizler neticesinde, Sarkoidoz hastalarında hsa-miR-22-3p referans miRNA'sına göre dört plazma miRNA'sı (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375,

hsa-miR-568, hsa-miR-9-5p) arasında anlamlı fark gösterirken, hsa-miR-93-5p referans miRNA'sına göre ise üç plazma miRNA'sı (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568) anlamlı fark göstermiştir. ROC analiz sonuçlarına göre; sarkoidozlu hastalarda (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 hsa-miR-9-5p miRNA'ların downregüle (aşağı regüle) olduğu tespit edilmiştir. İki referans miRNA'sına göre hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 miRNA'ları ortak olarak anlamlı bulunmuştur.

Tüberküloz hastalarında ise, ROC analiziyle, hsa-miR-22-3p referans miRNA'sına göre iki plazma miRNA'sı (hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-568) anlamlı fark göstermektedir. hsa-miR-93-5p referans miRNA'sına göre ise dört plazma miRNA'sı (hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, hsa-miR-9-5p) anlamlı bulunmuştur. ROC analiz sonuçlarına göre; tüberkülozlu hastalarda hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, hsa-miR-9-5p miRNA'ların upregüle (yukarı regüle) olduğu tespit edilmiştir. İki referans miRNA'sına göre hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-568 miRNA'ları ortak olarak anlamlı olarak belirlenmiştir.

Plazmadan elde edilen 10 miRNA arasından hsa-miR-375 ve hsa-miR-568 miRNA'ların, deneysel olarak seçilen sarkoidozlu bireylerde ekspresyon düzeylerinde azalma gözlenirken tüberkülozlu bireylerin ekspresyon düzeylerinden artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen sarkoidoz ve tüberküloz hasta gruplarında ortak olarak anlamlı olduğu tespit edilen hsa-miR-375 ve hsa-miR-568 miRNA'ları sarkoidoz ve tüberküloz ayırıcı tanısında kullanılabilir.

Sonuç:

Bu çalışma, tüberküloz ve sarkoidozda farklı düzeylerde etkili olan miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımını planlamak için önemli bir adım oluştururken, bu hastalıkların mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Tüberküloz, Sarkoidoz, miRNA.

ABSTRACT**The Role of miRNAs in the Differential Diagnosis of Granulomatous Lesions Associated with Sarcoidosis and Tuberculosis**

Background: It is aimed to use miRNAs as potential biomarkers in the differential diagnosis of sarcoidosis and tuberculosis by using the qRT-PCR method on 10 miRNAs and 2 reference miRNAs detected by bioinformatics analysis to determine the miRNA expression levels in the blood plasma of individuals with sarcoidosis and tuberculosis.

Materials and Methods: Between 2021 and 2022, patients who applied to the Department of Chest Diseases at the Istanbul Faculty of Medicine were evaluated in terms of diagnostic accuracy together with faculty members and medical specialization students, and after obtaining patient consent forms, blood samples were collected.

The expression levels of 10 miRNAs (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-1273e, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-3622b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, hsa-miR-9-5) identified through bioinformatics analysis, along with 2 reference miRNAs (hsa-miR-22-3p and hsa-miR-93-5p), were investigated for their value in the differential diagnosis of sarcoidosis and tuberculosis. These expression levels were determined from blood plasma samples of individuals with sarcoidosis and tuberculosis using the qRT-PCR method.

(Ethics Committee File No: 2021/364086)

Results: The study included 18 patients with tuberculosis (TB), 15 patients with sarcoidosis, and a control group of 20 individuals. The ΔC_t values between TB and the control group, based on the housekeeping reference gene hsa-miR-22-3p, showed statistical significance for hsa-miR-26b-5p and hsa-miR-568 ($p < 0.05$). Similarly, when comparing sarcoidosis and the control group based on hsa-miR-22-3p as the housekeeping reference gene, the ΔC_t values were statistically significant for hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, and hsa-miR-9-5p ($p < 0.05$). Moreover, the ΔC_t values between sarcoidosis and the control group, considering hsa-miR-93-5p as the housekeeping reference gene, were statistically significant for hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, and hsa-miR-9-5p ($p < 0.005$). Additionally, when using hsa-miR-93-5p as the housekeeping reference gene, the ΔC_t values between sarcoidosis and the

control group were statistically significant for hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, and hsa-miR-568 ($p < 0.05$).

Our analysis using the qRT-PCR method revealed significant differences among four plasma miRNAs (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, hsa-miR-9-5p) in sarcoidosis patients when compared to the reference miRNA hsa-miR-22-3p. Similarly, based on the reference miRNA hsa-miR-93-5p, three plasma miRNAs (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568) showed significant differences. According to the ROC analysis results, it was determined that in sarcoidosis patients, the miRNAs hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, and hsa-miR-9-5p were downregulated. Furthermore, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, and hsa-miR-568 were found to be significantly different using two reference miRNAs.

In tuberculosis patients, the ROC analysis revealed significant differences in two plasma miRNAs (hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-568) compared to the reference miRNA hsa-miR-22-3p. Similarly, based on the reference miRNA hsa-miR-93-5p, four plasma miRNAs (hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, hsa-miR-9-5p) showed significant differences. According to the ROC analysis results, it was determined that in tuberculosis patients, the miRNAs hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, and hsa-miR-9-5p were upregulated. Furthermore, hsa-miR-26b-5p and hsa-miR-568 were identified as significant miRNAs using two reference miRNAs.

Among the 10 miRNAs obtained from plasma samples, it was observed that hsa-miR-375 and hsa-miR-568 exhibited decreased expression levels in experimentally selected individuals with sarcoidosis, while their expression levels were increased in individuals with tuberculosis. These findings suggest that hsa-miR-375 and hsa-miR-568 may serve as potential biomarkers for differentiating between sarcoidosis and tuberculosis. In both the sarcoidosis and tuberculosis patient groups included in the study, hsa-miR-375 and hsa-miR-568 were found to be significantly associated, indicating their potential utility in the differential diagnosis of sarcoidosis and tuberculosis.

Conclusion: This study constitutes an important step towards planning the use of miRNAs, which are effective at different levels in tuberculosis and sarcoidosis, as biomarkers. It will contribute to a better understanding of the mechanisms underlying these diseases and the development of more effective treatment methods.

Keywords: Tuberculosis, Sarcoidosis, miRNA.

I. GİRİŞ

Sarkoidoz ve tüberküloz, klinik belirtiler ve histopatolojik özellikler açısından benzerlikler göstermektedir. Sarkoidoz ve tüberkülozun ayırıcı tanısı, özellikle tüberküloz yükünün yüksek olduğu ülkelerde zordur. Dolayısıyla sarkoidozun altında yatan genetik faktörlerin belirlenmesi ayırıcı tanıda önem arz etmektedir. Genetik olarak yatkın bireylerde, bir veya birden fazla ekstrensek antijenin inflamatuvar yolların aşırı aktivasyonuna neden olarak, sarkoidal granülomların oluşumuna sebep olduğu ortaya konulmuştur. Bu iki hastalığın teşhisi genellikle patolojiye ve Mycobacterium tuberculosis (MTB) kültürüne bağlıdır. Sarkoidoz, nekrotizan olmayan epitel açısından zengin granülomlarla karakterizedir. Tüberküloz, kazeifiye granülomlarla karakterizedir, ancak tipik belirtiler numunede her zaman görülmezken, balgam yayması ve MTB kültürünün duyarlılığı düşüktür.

Mikro RNA'ların (miRNA) birçok hastalığın moleküler mekanizması içerisinde önemli roller oynayabildiği literatürdeki birçok çalışmada gösterilmiştir(1). Öte yandan, bronkoalveolar lavaj (BAL) hücrelerindeki miRNA paterni ve bunların akciğer sarkoidozunda sitokin / kemokin-reseptör ağı ile ilgili düzenleyici kabiliyetleri hakkında bilgi bulunmamaktadır. Dyskova ve ark, sarkoidozda BAL hücrelerinde sitokin/kemokin reseptör ağının düzenlenmesinde hem çeşitli miRNA'ları hem de Th1-transkripsiyon faktörü T-bet'in gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır(2). Korelasyon analiz sonuçları, sitokin/kemokin gen ekspresyonunun "ince ayarlayıcıları" olarak işlev gören miRNA'lara göre T-bet'in sarkoidoz ile ilişkili kemokin reseptörlerine ve sitokinlere karşı daha belirgin düzenleyici kabiliyetini göstermiştir(2). Yine son yapılan çalışmalarda, konakçı miRNA'ların M. tuberculosis enfeksiyonuna karşı immün yanıtta ilgili rolünü, tüberküloz biyobelirteçleri olarak potansiyellerini ve terapötik müdahaleler için hedefler veya araçlar olarak etkileri vurgulanmıştır(3). M.tuberculosis, immün yanıtı kaçmak için miRNA ekspresyonunu indükleyebilir veya inhibe edebilir(4). Apoptotik yolun tetiklenmesi, otofajinin indüksiyonu, IFN'nin uyarılması ve tümör nekroz faktörü alfa sekresyonu, bakteriyel enfeksiyon sırasında konakçı hücreler tarafından kabul edilen mekanizmalardan bazılarıdır(3). LTBI'dan aktif tüberkülozda ilerleme riski veya anti-tüberküloz tedavilerine yanıtın tahmini ile ilişkili prognostik miRNA işaretini belirlemek amacıyla ileriye dönük çalışmalar yapılmıştır(1).

Güney Afrika ve Uganda'daki bir denek kohortunda 2 yıllık bir takipte aktif tüberküloz geliştiren, hastalığın ilerlemesinin önemli bir işareti olan miRNA'lar (miR-21-5p ve miR-148b-3p) tespit edilmiştir(5). Ayrıca, tanısal değeri olan bir miRNA imzasının tanımlanması, tedavi

sırasında takip edilen deneklerin değerlendirilmesine yardımcı olabilir. Teorik beklentiler, tanı sırasında deregüle edilen miRNA'ların, tedavi başarılı olursa temel değerlere dönebilmesidir(5). Bir Hindistan kohortunda yapılan bir çalışma, miR-16-5p ve miR-155-5p'nin akut tüberküloz hastalarında tanısal biyobelirteçler olarak çalıştığını, sağlıklı kontrollerde ve tedaviyi başarıyla tamamlayan tüberküloz hastalarında düzeylerin düşük olduğunu göstermiştir(6). miR-99b-5p, miR-29a-3p, miR-26a-5p'de ise, iki farklı qRT-PCR protokolü ile test edilen büyük bir Çin kohortunda başarılı tüberküloz tedavisine giren deneklerde anlatımının azaldığı tespit edilmiştir(7).

Önerilen çalışmada, sarkoidoz ve tüberküloz ayırıcı tanısında miRNA'ların değerini araştırmak için sarkoidozlu ve tüberkülozlu bireylerin kan serum/plazmalarından seçili miRNA profillerini belirlemeyi amaçladık.

Araştırmanın amacı

Bu çalışmanın amacı, sarkoidozlu ve tüberkülozlu bireylerin kan serum/plazmalarındaki miRNA anlatım düzeylerini belirlemek için biyoinformatik analizlerle tespit edilen 10 miRNA (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-1273e, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-3622b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, hsa-miR-9-5) ve 2 referans miRNA (hsa-miR-22-3p ve hsa-miR-93-5p) üzerinde qRT-PCR yöntemini kullanarak sarkoidoz ve tüberküloz arasındaki ayrım potansiyelini araştırmaktır.

II. GENEL BİLGİLER

1. Tüberküloz

Tüberküloz (TB), gelişmekte olan ülkelerde ciddi bir sağlık sorunudur (8). TB enfeksiyonunun erken teşhisi, hastalığın yayılmasını kontrol altına almak ve TB salgını için erken tedavi sağlamak için esastır (9). Enfeksiyonun doğrudan kanıtını sağlayan tüberküloz kültürü, altın standart teşhis testidir (10). Ancak, yöntem zaman alıcı ve tespit oranı düşüktür. Ayrıca, HIV koenfeksiyonu veya ekstrapulmoner TB olan kişilerde tespit oranı düşüktür(11). Bu nedenle, tüberkülozun teşhisi için balgam örneklerinde PCR ile yapılan DNA temelli moleküler test önerilmektedir (11). Ancak, PCR temelli yöntemler kontaminasyona bağlı yanlış pozitif sonuçlara neden olma eğilimindedir (11). Ayrıca, her iki test de tedavinin etkililiğini izlemek ve tüberkülozun giderek artan bir sorun haline gelen çoklu ilaca dirençli olasılığını tahmin etmek için uygun değildir(11).

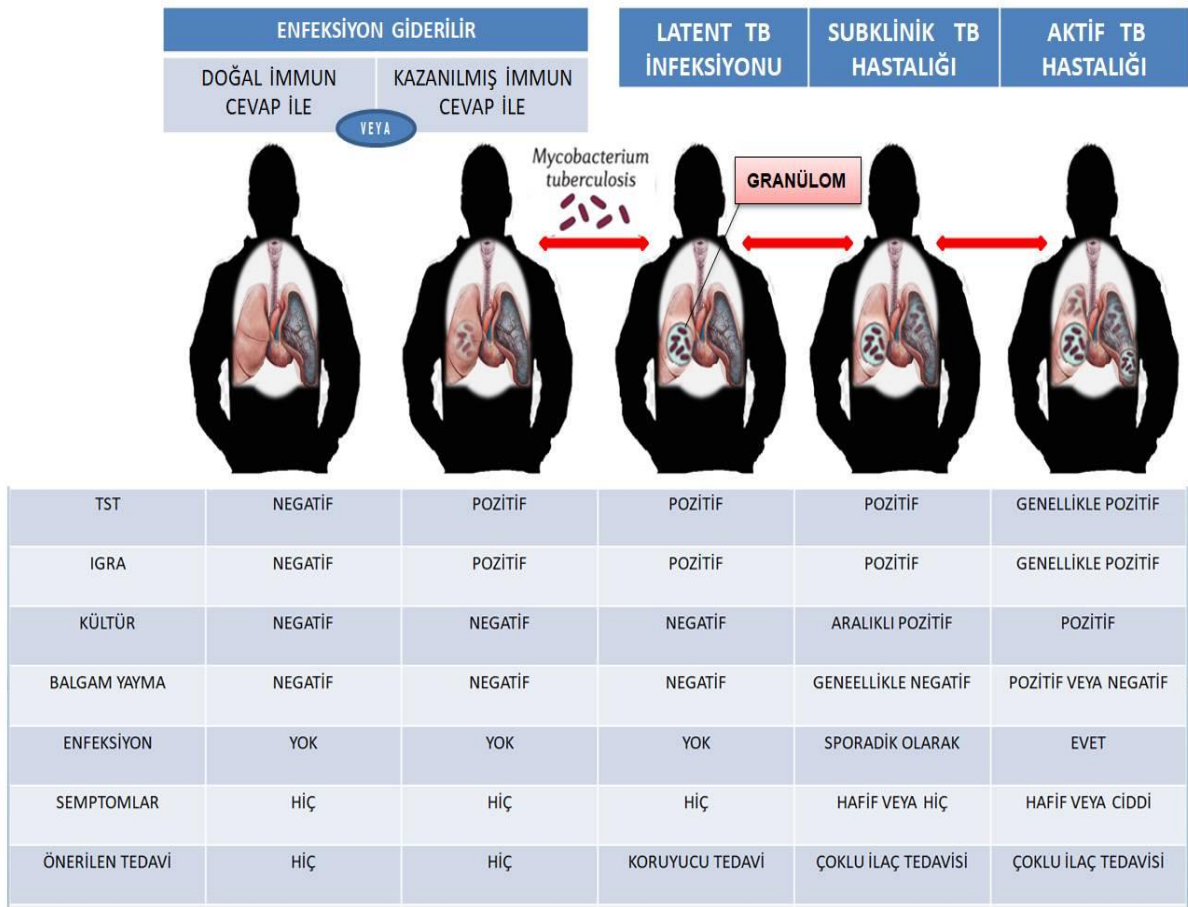
A. Tanım

Mycobacterium tuberculosis kompleksi (MTBK), hayvanlar ve insanlarda tüberküloza neden olan dokuz yakın akraba mikobakteri türünü içeren bir bakteri grubudur (12). *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBK), genetik olarak ilişkili *Mycobacteria* grubundan oluşan bir taksonomik gruptur ve bu grup *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), *Mycobacterium africanum* (*M. africanum*), *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), *Mycobacterium canettii* (*M. canettii*), *Mycobacterium microti* (*M. microti*), *Mycobacterium pinnipedii* (*M. pinnipedii*) ve *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*) türlerini içermektedir (13). Bu türler içinde en yaygın ve klinik açıdan en önemlisi, insan tüberkülozunun başlıca nedeni olan *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) türüdür (14). Bu bakteri grubu genellikle spor oluşturmayan, aerobik, hareketsiz, Gram-pozitif, asit-alkol dirençli basıl türleri olup hafifçe kıvrılmış şekle sahiptirler ve mikolik asit hücre duvarlarından bazı dallanmalar gösterebilirler (13).

B. Enfeksiyon

Mycobacterium tuberculosis enfeksiyonu, hem birincil hem de ikincil tüberküloz (reaktivasyon TB) oluşumuna neden olabilir (15) . Birincil TB enfeksiyonu genellikle *M.*

tuberculosis'ün granülomlarda kontrol edilip lokalize edilememesi durumunda, yetersiz bağışıklığı olan bireylerde meydana gelir (16). *M. tuberculosis* enfeksiyonu, menenjit, AIDS'li insanlarda yaygın tüberküloz, miliyer tüberküloz ve ekstrapulmoner granülomlar gibi geniş bir klinik spektruma neden olabilir. Bu enfeksiyon genellikle bağışıklık sistemi zayıf olan veya tamamen gelişmemiş olan çok genç veya yaşlı bireyleri etkiler (17). Ancak, bağışıklık sistemi sağlam olanlarda, primer TB enfeksiyonu etkili sistemik bağışıklık oluşturarak yaygın enfeksiyonu durdurabilir ve koruyucu bir etki sağlar (18) (Şekil 1) .



Şekil 1: Verem (TB) spektrumu - *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonundan aktif (akciğer) TB hastalığına kadar.

M. tuberculosis ile temas eden bireylerin çoğu, LTBI şeklinde enfeksiyonu kontrol edebilirken, tahmini olarak %5 ila %10'u aktif tüberküloz hastalığı geliştirir (12). Bu hastalık, sürekli öksürük, balgam üretimi, kilo kaybı, güçsüzlük ve gece terlemesi gibi belirtilerle tanımlanmaktadır. *M. tuberculosis* enfeksiyonunun klinik tanısı ve tedavisi, çeşitli eş enfeksiyonlar ve eşlik eden hastalıklar nedeniyle karmaşıktır (18).

(ikinci büyütmede gösterildiği gibi) bakterileri fagositoz yapacak ve yok etmeye çalışacaktır. Dendritik hücreler T-helper hücrelerini aktive etmek için lenf düğümlerine göç edecektir. M. tuberculosis fagositozom füzyonunu önler (C), yok edilmeyi önler, replikasyona başlar ve DNA, RNA, proteazlar ve lipidler salar. Ek olarak, makrofajlar sitokinler ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılayacaklar. VEGF anjiyogenez başlatacak ve lezyona kan damarlarının artmasını sağlayacaktır. Sitokinler, doğal öldürücü (NK) hücrelerini, dendritik hücreleri (DC), nötrofilleri ve farklı formlardaki makrofajları bağışıklık yanıtını başlatmak ve çekmek için harekete geçirecektir. T-helper hücre yanıtı, germinal merkezde önceden uyarılmış TH1, Tregs ve B hücrelerinin göçünü içerecektir (D). Bu hücreler, granülomu (E) oluşturmak için birleşecektir. Granülom, bakterilerin sistemik yayılmasını önlemek için bir hapishanedir. Daha sonrasında bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde (F) granüloma bakterileri kontrol altında tutamaz. Bu aşamada, enfekte kişi tekrar aerosolize etme potansiyeline sahip olabilir ve diğer kişilere enfeksiyon yayılabilir (G).

2. Sarkoidoz

Sarkoidoz ilk olarak Besnier ve arkadaşları tarafından 1889'da tanımlanmıştır (19). Sarkoidoz, nedeni bilinmeyen, çeşitli organların non-nekrotizan granülomlarla infiltrasyonu ile karakterize çok sistemli bir hastalıktır. Sarkoidoz, hala nedeni bilinmeyen bir hastalık olmasına rağmen, granülom oluşumuna neden olan mekanizmalar, genetik yatkınlık ve çevresel faktörler de dahil olmak üzere giderek daha iyi anlaşılmaktadır (20). Sarkoidozda en sık etkilenen organlar akciğerler ve intratorasik lenf nodlarıdır (hastaların %90'ından fazlasında) (21). Her etnik kökenden insanı etkileyebilir ve yaşamın herhangi bir döneminde ortaya çıkabilir, ancak Afrika kökenli Amerikalılarda ve İskandinavlar ile 30-50 yaş arasındaki yetişkinlerde daha yaygın görülür (19).

A. Tanım

Sarkoidozun klinik görünümü, organların etkilenme durumuna ve şiddetine bağlı olarak değişebilir. Tanı, öykü, fizik muayene, uygun radyolojik ve patolojik bulguların yanı sıra diğer nedenlerin dışlanması temel alınarak konulur (22). Sarkoidoz hastalarının yaklaşık %5'i hastalıktan ölür (23),(24) . Sarkoidoz kaynaklı ölümlerin en yaygın nedenleri akciğer ve kalp hastalıklarıdır (25). Beyin, göz veya böbreklerde geri dönüşümsüz organ hasarı da önemli morbiditeye neden olabilir (Tablo 1).

Tablo 1. Tanı anında organların genel olarak etkilenme sıklığı*

ORGAN TUTULUMU	SIKLIK %
AKCİĞER	90
CİLT	16
ERİTEMA NODOZUM	8
GÖZ	12
EKSTRATORASİK LENF NODU	15,2
KARACİĞER	12
DALAK	7
NÖROLOJİK	5
KARDİAK	2

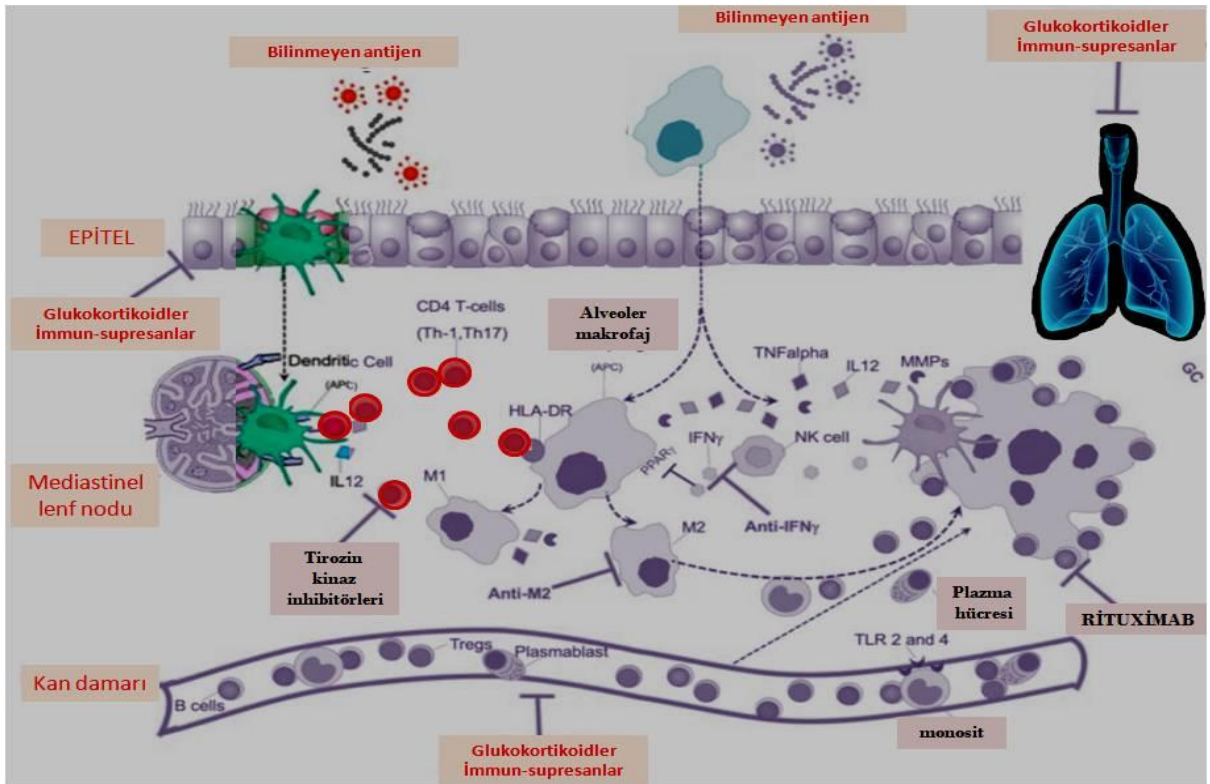
* Hastalarda birden fazla organ etkilenebilir. (Baughman RP ve diğ. (2001) kaynağından uyarlanmıştır (26))

Sarkoidozun tanısı ve takibi için birçok klinik ve radyolojik ölçüt kullanılmaktadır. Bunlardan biri, Scadding/Siltzbach tarafından 1961 yılında önerilen ve halen kullanılan bir sınıflandırma sistemidir (27). Bu sistem, hastaların göğüs röntgeninde görülebilen lezyonlara göre dört gruba ayrılmaktadır. Birinci grup, yalnızca hilus lenfadenopatisi olan hastaları içermektedir. İkinci grupta, lenfadenopatiye ek olarak parankimal infiltrasyonlar da mevcuttur. Üçüncü grupta ise lenfadenopati olmadığı halde akciğer parankimasında lezyonlar görülür. Dördüncü grup ise fibrotik lezyonlara sahip hastalardan oluşur. Scadding, 136 hastadan oluşan bir hasta grubunu temel alarak, her bir gruptaki hastaların sarkoidoz hastaları arasındaki yaygınlığını ve spontan remisyon olasılıklarını değerlendirmiştir. Bu sınıflandırma sistemi, sarkoidozun farklı evrelerini belirlemek için kullanılabilecek bir araç olarak kabul edilir (27).

B. Patogenez

Sarkoidoz teşhisi standartlaştırılmamış olsa da, uygun klinik sunum, bir veya daha fazla doku örneğinde non nekrotizan granümatöz inflamasyonun tespiti ve granümatöz hastalığın alternatif nedenlerinin dışlanması gibi üç temel kriter üzerine kuruludur (28). Enflamatuvar süreç, sarkoidozun patolojik belirtisi olan non nekrotizan granülomların oluşumuna yol açar. Granülomlar, mononükleer hücrelerin ve makrofajların birikmesinden oluşan epitelyoid ve

multinükleer dev hücelere farklılaşan hücre topluluklarıdır ve lenfositler, plazma hüceleri, fibroblastlar ve kollajen tarafından çevrenirler (29). Granülom içinde, özgülüğü bilinmeyen CD4+ T hüceleri bulunurken, periferde CD8+ T hüceleri, düzenleyici T hüceleri (Treg'ler), fibroblastlar ve B hüceleri yer almaktadır. Bu heterojen hücre popülasyonu, hastalığın başlangıcına ve ilerlemesine hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık yanıtlarının katkıda bulunduğunu göstermektedir. Ancak bugüne kadar sarkoidozun patogenezi, çözölememiş bir immünolojik paradoks olarak kalmaktadır (30). Sarkoidozda, etkilenen organlar yoğun bir immün yanıt sergilerken, aynı zamanda, tüberkülin ve yaygın antijenlere gecikmiş tip aşırı duyarlılıkta azalma gibi bir immün anerji durumu da oluşur (29) (Şekil 3).



Şekil 3. Sarkoidozun Patolojisi ve Mevcut Tedavi Yaklaşımları

Sarkoidozun Patolojisi ve Mevcut Tedavi Yaklaşımları: Bilinmeyen bir hava yolu antijeni, interstisyel dendritik hüceleri (DC'ler) ve alveolar makrofajları (AM'ler) eş zamanlı olarak etkinleştirir. İnterstisyel DC'ler antijeni alır ve mediastinal lenf düğümlerine doğru göç ederek antijen sunan hücelere (APC'ler) olarak görev yapar (T yardımcı (Th) 1 ve 17 hücelerinin farklılaşmasını ve klonal genişlemesini başlatarak) Eş zamanlı olarak AM'ler: (1) DC'lerle birlikte APC olarak görev yapar; (2) M1 ve M2 makrofajları olarak farklılaşır ve daha sonra inflamatuvar süreci (M1), fibroblast proliferasyonunu ve fibrotik doku birikimini (M2)

indükler; ve (3) pro-inflamatuar sitokin tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ile insan lökosit antijeni (HLA)-DR ve TNF- α ve doğal öldürücü hücre kaynaklı interferon- γ (INF- γ) tarafından uyarılmasıyla IL-12 gibi diğer kemotaktikler üretir. APC'ler aracılığıyla sürekli olarak devam eden uyarılma, B hücreleri, plazma hücreleri, Th1/17 hücreleri, daha yüksek Toll Benzeri Reseptör (TLR)2 ve TLR4 ifade eden monositlerin (sırasıyla Th1 ve Th2 yanıtlarını indükleyen), ve düzenleyici T hücreleri (Treg'ler) gibi kan dolaşımından akciğere hücrelerin sürekli olarak çekilmesine neden olur, burada granülom oluşumuna katkıda bulunurlar. Granüloma içine sızan Treg'ler, aşırı bağışıklık yanıtını azaltamazlar, böylece granüloma kalıcılığına ve bütünlüğüne katkıda bulunurlar. Bu şekilde sarkoidoz için kullanılan/test edilen tedavi hedefleri de belirtilmiştir.

Akciğerde granülom oluşumunu tetikleyen CD4+ lenfositler güçlü bir Th1 fenotipi gösterirler. Bu hücrelerin akını daha fazla Th1 lenfositleri ve makrofajları çekerek interferon-gamma (INF γ), interleukin (IL-2) ve IL-15 gibi sitokinler üretirler. Ayrıca IL-12 ve IL-18 üretimi de artar, bu da akciğerde INF γ üretimini artırır ve Th0 öncüllerinin aktif Th1 lenfositlerine farklılaşmasını indükler ve böylece yanıt sürdürülür (31).

3. MikroRNA (miRNA)'lar ve özellikleri

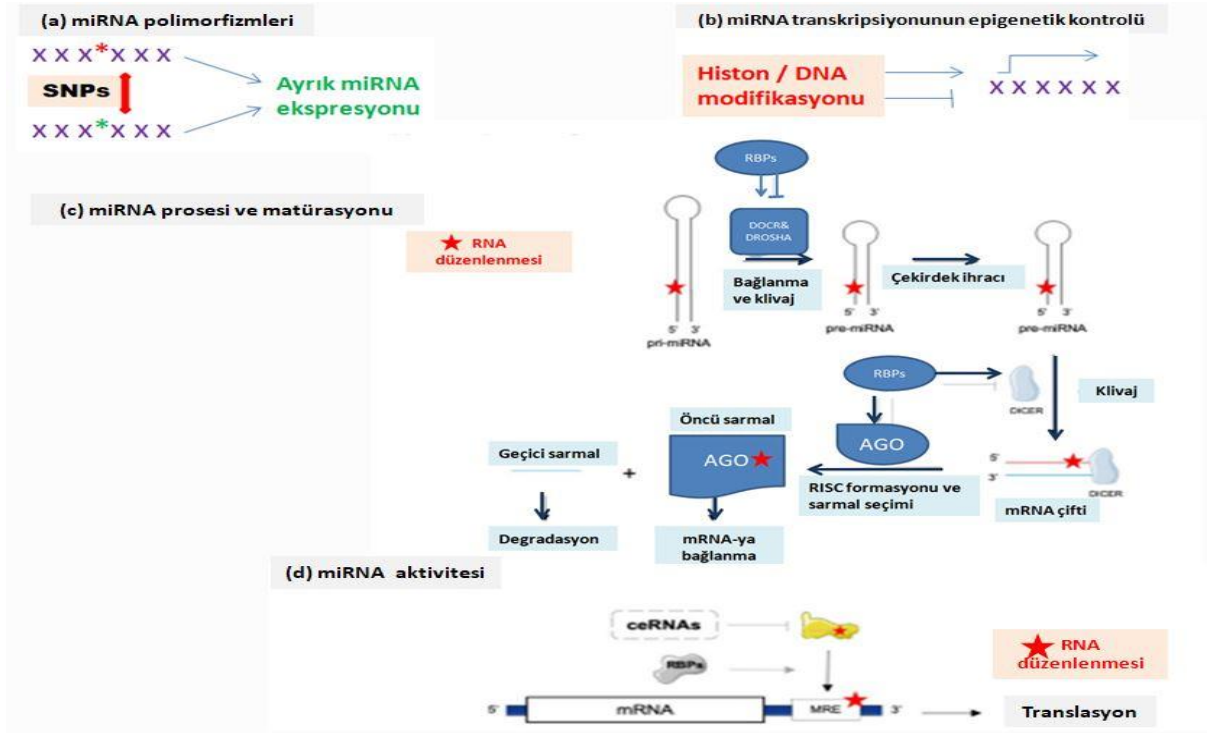
MikroRNA'lar (miRNA'lar), transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen küçük endojen RNA'lardır. miRNA'lar, hedef genlerin transkripsiyon sonrası susturulmasını düzenleyen 19 ila 25 nükleotit boyutunda kısa RNA molekülleridir. Tek bir miRNA, yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilir ve genellikle işlevsel bir etkileşim yolunda yer alan birçok genin ifadesini etkileyebilir. Şu anda prelinik geliştirme aşamasında olan miRNA mimikleri(kimyasal olarak sentezlenmiş, çift sarmallı miRNA benzeri RNA) ve miRNA inhibitörleri, yeni terapötik ajanlar olarak ümit vaat etmektedir. miRNA izolasyonu, miRNA ölçümü, miRNA profillemesi, miRNA hedef tespiti ve miRNA seviyelerini in vitro ve in vivo modüle etmek için çok sayıda teknolojik platform geliştirilmiştir (32).

Kanonik biyosentetik yolda, çift sarmallı RNA'ya özgü endoribonükleaz (DROSHA) ve DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8 (DGCR8) enzimlerini içeren bir mikroişlemci kompleksi tarafından tanınan bir birincil miRNA (pri-miRNA) kopyalanır ve bir haberci miRNA oluşturmak üzere bölünür. Pre-miRNA'lar daha sonra DICER enzimi ve protein kinaz R'nin protein aktivatörü (PACT) veya Trans-aktivasyon yanıtı RNA-bağlayıcı protein (TRBP) gibi yardımcı faktörler tarafından daha fazla işlenmek üzere sitoplazmaya ihraç edilir. Olgun miRNA dubleksini nihayet bir çoklu protein kompleksine yüklenir, RNA kaynaklı susturma

kompleksi (RISC) ve seçilen bir miRNA ipliği (-5p veya -3p) Argonaute (AGO) proteinine bağlanır, kompleksi hedef mRNA'sına yönlendirir.

Bununla birlikte, miRNA'ların biyogenez ve olgunlaşması, hücrelerin ve çevrelerinin fizyopatolojik durumlarına duyarlı çoklu hücrel faktörlerin kontrolü altında, çok daha karmaşık ve sıkı bir şekilde düzenlenen süreçler gibi görünmektedir. DNA düzeyinde, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) ve DNA/histonların klasik asetilasyon/metilasyon mekanizmaları yoluyla transkripsiyonun epigenetik kontrolü, etkilerini yöneten miRNA düzenlemesinin birinci seviyesini temsil eder (Şekil 4a,b).

miRNA'ların biyosentezi ve olgunlaşması, DROSHA/DGCR8/DICER ve RISC kompleksi (Şekil 4c,d) gibi bu işlemlerde anahtar enzimlerle etkileşime girebilen RNA bağlayıcı proteinlerden (RBP'ler) de etkilenebilir (33). Bu tür mekanizmaların örnekleri, Lin28 bağlanmasıyla indüklenen let-7 miRNA işleminin inhibisyonu veya pri- ve/veya pre-miR-144'ün BUD13 ve İnterlökin Arttırıcı Bağlanma Faktörü 3 (ILF3) tarafından olgun formların artan seviyelerine yol açan stabilizasyonu ile gösterilmektedir (33). Son olarak, pri/pre-miRNA'ların düzenlenmesi, miRNA'ların hedefleri üzerindeki eylemlerini derinden etkilemenin yanı sıra, belirli miRNA'ların biyosentezini ve olgunlaşmasını modüle eden önemli bir mekanizmadır (Şekil 4c,d) (33).



Şekil 4. MikroRNA (miRNA) biyogenezini ve aktivitesini kontrol eden moleküler mekanizmalar.

(a) miRNA'ları kodlayan genomik bölgelerdeki tek nükleotit polimorfizmleri (SNP'ler), bunların işlenmesini ve olgunlaşmasını etkileyerek varyantlar arasında farklı ifade seviyelerine neden olabilir (33).

(b) Histon asetilasyon veya DNA metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonlar, miRNA'ların transkripsiyon etkinliklerini modüle edebilir (33).

(c) RNA düzenleme (kırmızı yıldızlar) ve RNA bağlayıcı proteinler (RBP'ler), DGCR8/DROSHA aktivitesini, pre-miRNA'ların nükleer ihracatını, pre-miRNA'nın DICER tarafından bölünmesini ve olgun miRNA'nın RISC kompleksine dahil edilmesini etkileyerek miRNA işlemesine ve olgunlaşmasına müdahale edebilir (33).

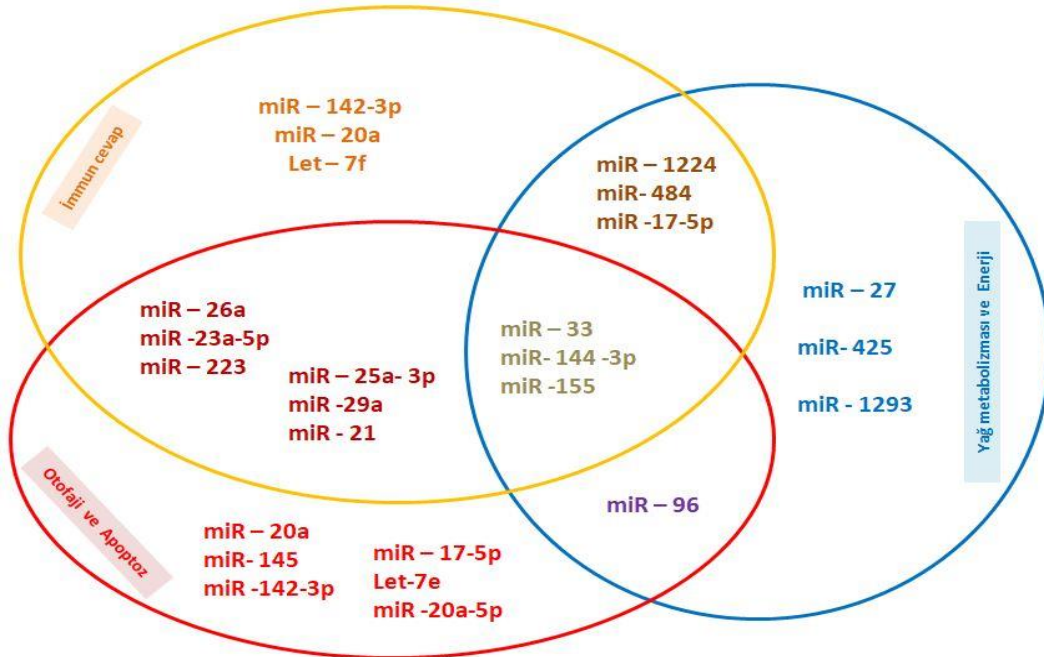
(d) Olgun miRNA aktivitesi, (i) bir hedef mRNA'da aynı bağlanma bölgesi için RBP'lerle rekabet, (ii) miRNA-RISC kompleksinin ceRNA'lar tarafından çözülmesi ve (iii) hedef mRNA'larda miRNA yanıt öğelerinin RNA düzenlemesi. Uyarıcı ve engelleyici etkiler, sırasıyla sivri ve küt gri oklarla temsil edilir (33).

4. Tüberküloz Patogenezinde miRNA'lar

İn vitro ve in vivo deneyler, makrofajlar, dentritik hücreler (DC)'ler, doğal öldürücü ve T hücreleri gibi M. tüberküloz'un ana hedef hücrelerinde gen ekspresyonunun modüle edilmesinde miRNA'ların rol oynadığını doğrulamıştır. M. tuberculosis, bağışıklık tepkisinden kaçmak için miRNA ekspresyonunu indükleyebilir veya inhibe edebilir (5). Apoptotik yolağın tetiklenmesi, otofajinin indüklenmesi, IFN γ 'nin uyarılması ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) salgılanması, bakteriyel enfeksiyon sırasında konak hücreler tarafından benimsenen mekanizmalardan bazılarıdır (5). Örneğin, TB hastalarında yukarı regüle edilen miRNA'lar arasında, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-99b-5p ve miR-132-5p, miyeloid hücrelerde Toll benzeri reseptör sinyali tarafından tetiklenen konakçı inflamatuvar yolları negatif olarak düzenler. Böylece M. tuberculosis'in hayatta kalmasını teşvik eder. miR-27a-5p, miR-33, miR-125-5p ve miR-144-5p gibi M. tuberculosis ile enfekte olmuş makrofajlarda yukarı regüle edilen diğer miRNA'lar, otofagozom oluşumunu ve makrofajlar tarafından M. tuberculosis öldürmeyi inhibe eder. Her ikisi de enfekte makrofajlarda yukarı regüle edilen miR-29a-3p ve miR-125-5p, doğrudan IFN γ ve TNF α 'yı hedef alarak hücre içi M. tuberculosis'e karşı bağışıklık yanıtını baskılar. Hücre apoptozu ve enflamasyon indüksiyonu, miR-325-3p ve miR-20b-5p gibi M. tuberculosis ile modüle edilmiş konakçı miRNA'lar tarafından düzenlenen hücre içi patojenlere karşı diğer savunma mekanizmalarıdır (5). Öte yandan, M. tuberculosis enfeksiyonunun seyrinde modüle edilen miR-155-5p ve let-7f gibi bazı miRNA'lar, konağın doğal ve adaptif bağışıklığının aktivasyonunda ve bakterilerin temizlenmesinde anahtar rol oynar (5).

Konak hücre içinde Mtb büyümesi ve çoğalması için gereken besinler kısıtlanır ve bu nedenle bakteri, besin tedarikini sağlamak için konağın hücre metabolizmasına güvenir. Örneğin; Mtb, enfeksiyon sırasında merkezi karbon kaynağı olarak lipidleri kullanır ve bu nedenle konakçı lipid metabolizması hedeflenir. Klinik numunelerdeki mikroarray analizine ve in vitro çalışmalara göre miR-155, miR-33 ve miR-1224, Mtb ile enfekte makrofajlarda artan metabolik ilişkili miRNA'lardır. Bu miRNA'lar makrofaj metabolizmasında ve köpük hücre üretiminde kritik rollere sahiptir. miR-155, Mtb ile enfekte olmuş makrofajlarda aşırı eksprese edilir ve ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı ABCA1 için korunmuş bir bağlanma bölgesine sahiptir.

Kolesterol dışı akış düzenleyici protein olarak da bilinen ABCA1, kolesterol akışını düzenleyen hücresel bir taşıyıcıdır. Mtb, uzun süreli kalıcılığı için kolesterol metabolizmasına bağlıdır ve ABCA1 yıkımı, kolesterol alımını artırır. miR-33a/b, lipid metabolizmasını ve ABCA1, CROT, CPT1, HADHB ve PRKAA1 dahil olmak üzere yağ asidi oksidasyon genlerini hedefler ve ardından enfekte hücrelerde lipid seviyelerini artırır. Mtb, konakçı lipid metabolizmasını yeniden programlamak için konakçı miR-33 ekspresyonunu indükler ve hücresel yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonu yoluyla makrofaj lipid depolarını destekler. Lipid metabolizmasının ana düzenleyicisi olan miR-1224, insan makrofajlarında Mtb enfeksiyonundan sonra da düzenlenir. miR-1224, SP1 gibi transkripsiyon faktörleri tarafından doğrudan düzenlenen lipid ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenler. Diğer metabolik miRNA'ların bazılarının da Mtb enfeksiyonundan etkilendiği bildirilmektedir (Şekil 5) (34).

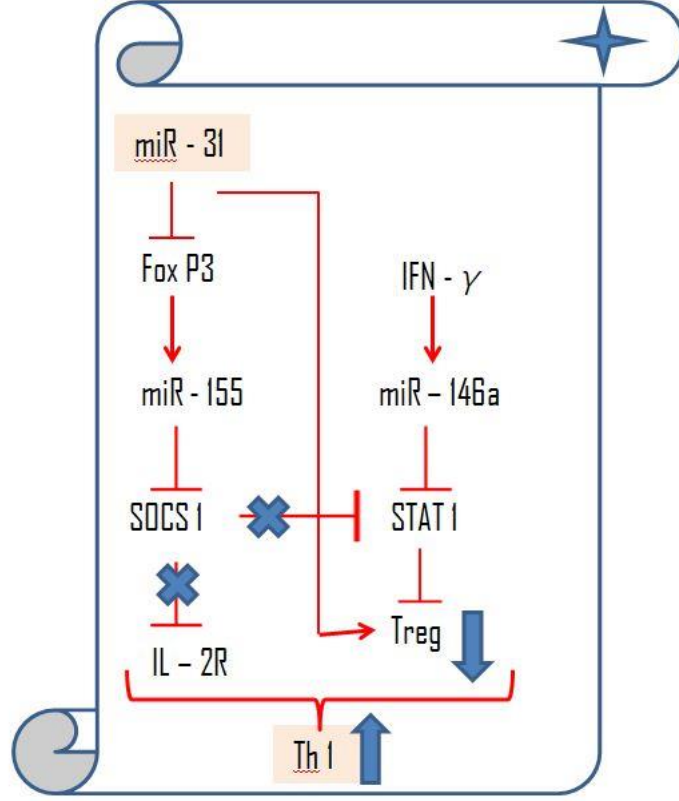


Şekil 5. Mycobacterium tuberculosis (Mtb) immün kaçış mekanizmalarında yer alan miRNA'lar

Mtb, bu yollarda yer alan spesifik genleri hedefleyen birçok konakçı hücre miRNA'sının ekspresyonunu modüle ederek konakçı hücrelerde konakçı bağışıklık tepkilerini, otofaji sürecini ve ayrıca hücre metabolizmasını modüle eder (34).

5. Sarkoidoz Patogenezinde miRNA'lar

Sarkoidoz, etkilenen dokuların, çoğunlukla T helper 1 (Th1) hücreleri ve çok çekirdekli dev hücrelerden oluşan, nekrotizan olmayan granüloamatöz yapılarla invaze olduğu bir çoklu organ hastalığıdır. Bununla birlikte, sarkoidozun etiyolojisi ve patogenezi bilinmemektedir ve tanı genellikle radyografi ve etkilenen organların biyopsilerinin histopatolojik analiz ile klinik muayeneye dayanır. Sarkoidozun moleküler arka planı hakkındaki bilgiler sınırlı olsa da, önemli yolların, interferon- γ (IFN- γ) aracılı sinyallemeyle etkileyebilecek transforme büyüme faktörü- β (TGF- β) ve JAK/STAT'ı kapsadığı görülmektedir. Ek olarak, son zamanlarda küçük kodlayıcı olmayan RNA molekülleri olan mikroRNA'ların (miRNA'lar) otoimmün hastalıklar da dahil olmak üzere farklı patolojik durumlardaki rolü vurgulanmıştır (35). Sarkoidoz bu bağlamında, bağışıklık sistemindeki anormalliklerin bir şekilde miRNA molekülleri tarafından translasyonun düzenlenmesiyle bağlantılı olup olmadığını belirlemek önemlidir. T hücrelerinin Treg lenfositlerine farklılaşması için gerekli bir transkripsiyon faktörü olan FoxP3'ün miR-155 ekspresyonunu indüklediği, ancak Treg immünosupresif fonksiyonlarını etkilemediği not edilmelidir. Ayrıca miR-155'in Th1 hücreleri tarafından IL-2 ve IFN- γ gibi sitokinlerin salınması için gerekli olduğu ve timik farklılaşma durumunda sitokin sinyalleme 1'in baskılayıcısını (SOCS1) aşağı regüle ettiği gösterilmiştir; IL-2R sinyalinin düzenleyicisi ve hücrelerin hayatta kalmasını düzenler (Şekil 6). Hastaların kanında ve lenf düğümlerinde artan düzenleyici lenfosit sayısı göz önüne alındığında, bu molekül gelecekteki tedaviler için olası bir hedef olabilir (36).

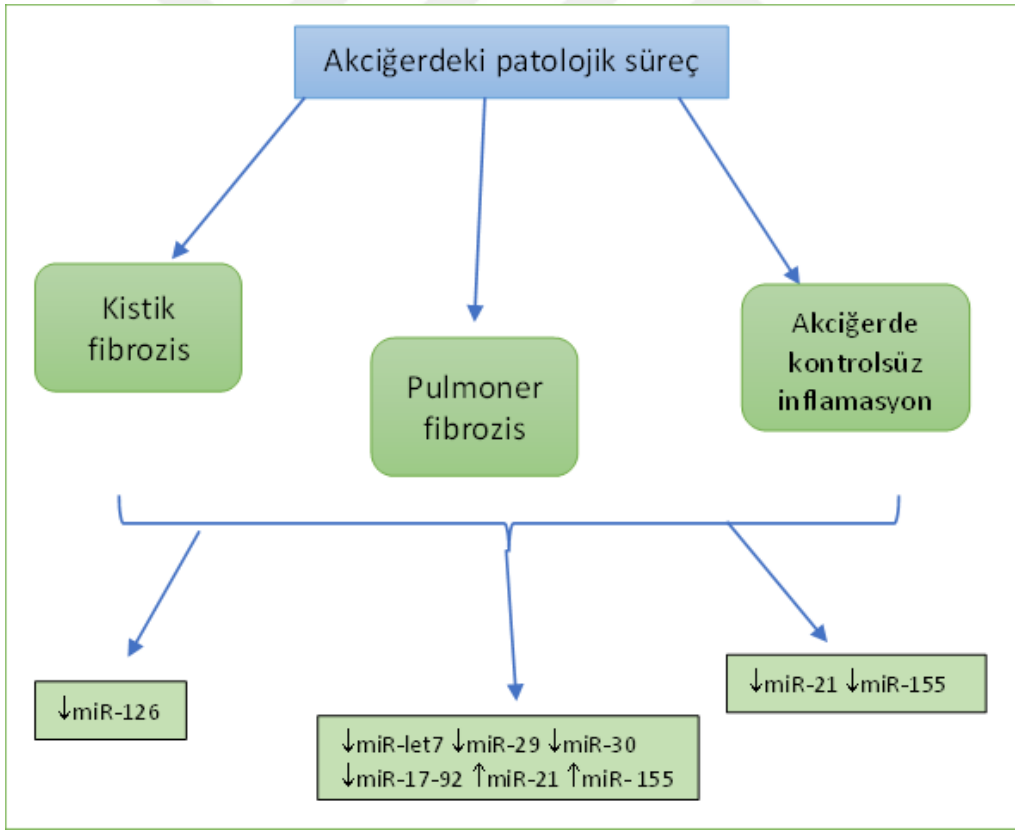


Şekil 6. T hücresi gelişiminin ve fonksiyonunun mikroRNA aracılı düzenlemesi- sarkoidoz patogeneğinde miRNA'ların olası katılımını gösteren bir akış şeması

miR-31 tarafından bloke edilebilen T lenfositlerinin T düzenleyici hücelere farklılaşmasının ana düzenleyicisi olan FoxP3, STAT1 sinyalinin negatif bir düzenleyicisi olan SOCS1'i hedefleyen miR-155 ifadesini indükler. Aksine IFN- γ tarafından aktive edilebilen miR-146a, STAT1'i baskılar ve Treg hücrelerinin sayısını azaltır. SOCS1 aynı zamanda IL-2R sinyalinin negatif bir regülatörüdür ve bunun yukarı regüle edilmiş miR-155 tarafından inhibisyonu Th1 hücre sağkalımını iyileştirebilir. Sonuç olarak, sarkoidozda Th1 hücrelerine doğru bir kayma olabilir (36).

miRNA'lar, transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu negatif olarak düzenleyebilen küçük, endojen kodlamayan RNA'lar olarak tanımlanır. Yüzlerce insan mikroRNA'sı bilinmesine rağmen, bunların sarkoidoz da dahil olmak üzere insan hastalıklarındaki patolojik rollerine ilişkin bilgiler hala sınırlıdır. Son araştırmalar, miRNA'ların, diğer miRNA'ların eylemleri üzerindeki etkilerinin yanı sıra, kendi üretimlerinin dolaylı kontrolü yoluyla bağışıklık tepkilerinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Yakın zamanda yürütülen bir çalışma, miRNA'ların, geçiş benzeri reseptörleri (TLR'ler) uyaran lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel bileşenlere karşı bağışıklık yanıtını değiştirme sürecine

dahil edildiğini doğrulamıştır (37). Son çalışmalar, B- ve T-hücrelerinin (örneğin; miR-155, miR-181a ve küme miR-17~92) gelişimi ve farklılaşmasının yanı sıra bağışıklık tepkisinin düzenlenmesi (miR-155) ve iltihaplanmanın ilerlemesini veya kronik durumunu belirleyen pro ve anti-inflamatuar sinyallerin genel dengesi (miR-146a) içeren miRNA'ların bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca, birçok miRNA sınıfı, akciğer gelişimi, hücre akciğer homeostazı (miR-155, miR-26a, miR-29, let-7f, miR-223, miR-146a) için çok önemli olarak kabul edilmektedir ve birçok akciğer hastalığında (miR-155, miR-126) düzenleyici faktörler olarak işlev görür. MiRNA'ların ve sitokinlerin etkileşimi, T ve B lenfositlerinin aracılık ettiği bağışıklık tepkisine katkıda bulunur. (38). Akciğerdeki patolojik süreçlerde yer alan en önemli miRNA'lar arasında miR126, miR-7, miR-21, miR-29, miR-30, miR-17-92, let-7d, miR-155, miR-223 bulunur. miR-126'nın kistik fibrozis hava yolu epitel hücrelerinde aşağı regüle edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, miR155 ve miR-21'in, alerjik akciğer iltihabına karıştığı kabul edilmiştir ve burada azalmış ifade tespit edilmiştir (Şekil 7) (38).



Şekil 7. Akciğerlerde meydana gelen patolojik süreçlerde yer alan deregüle edilmiş miRNA sınıfları. Kısaltmalar: miR — microRNA, ↓azalan ifade, ↑ artan ifade

III. GEREÇ ve YÖNTEM

1. miRNeasy Serum/ Plasma Advanced Kit ile RNA izolasyonu

1. Serum veya plazma hazırlanır veya donmuş numuneler çözülür.
2. 200 µl serum veya plazma 2 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
3. 60 µl Tampon RPL eklenir. Tüp kapakları kapatılır ve >5 s vortekslenir. Oda sıcaklığında (15–25°C) 3 dakika bekletilir.
4. 20 µl Tampon RPP eklenir. Tüp kapakları kapatılır ve >20 saniye vorteksleyerek kuvvetlice karıştırılır. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilir. İyice karıştırma, sonraki faz ayrımı için önemlidir.
5. Çökeltiyi peletlemek için oda sıcaklığında 3 dakika 12000 x g'de santrifüjlenir. Not: Süpernatant berrak ve renksiz olmalıdır.
6. Süpernatant (200 µl serum/plazma için ~230 µl) yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. 1 hacim izopropanol eklenir. Vorteksleyerek iyice karıştırılır.
7. Numunenin tamamını bir RNeasy UCP MinElute sütununa aktarılır. Kapak kapatılır ve ≥ 8000 x g'de 15 saniye santrifüjlenir. Altta kalan atılır.
8. Numunenin tamamı bir RNeasy UCP MinElute sütununa aktarılır. Kapak kapatılır ve ≥ 8000 x g'de 15 saniye santrifüjlenir. Altta kalan atılır. Bir sonraki adımda toplama tüpü yeniden kullanılır.
9. RNeasy UCP MinElute döndürme kolonuna 500 µl Buffer RPE pipetlenir. Kapağı kapatılır ve ≥ 8000 x g'de 15 saniye santrifüjlenir. Altta kalan atılır. Bir sonraki adımda toplama tüpü yeniden kullanılır.
10. RNeasy UCP MinElute döndürme kolonuna 500 µl %80 etanol eklenir. Kapağı nazikçe kapatılır ve döndürme kolonu membranını yıkamak için ≥ 8000 x g'de (≥ 10.000 rpm) 2 dakika santrifüjlenir. Altta kalanı atılır.
11. RNeasy UCP MinElute döndürme kolonu 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir. Döndürme kolonunun kapağı açılır ve membranı kurutmak için tam hızda 5 dakika santrifüjlenir. Altta kalan ve toplama tüpü atılır.
12. RNeasy UCP MinElute döndürme kolonu yeni bir 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirilir. Döndürme kolonu zarının merkezine doğrudan 20 µl RNaz içermeyen su eklenir ve 1 dakika inkübe edilir. Kapak kapatılır ve RNA'yı ayrıştırmak için tam hızda 1 dakika santrifüjlenir.

2. cDNA Sentezi

Örneklerden cDNA sentezi, miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN) ve BIO-RAD C1000 Thermal Cycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir RNA örneği için cDNA sentez mix protokolü Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Her bir RNA örneği için cDNA sentez mix protokolü.

	1 reaksiyon
5x miRCURY RT Reaction Buffer (Probe)	4 µl
RNase-free water	10 µl
10x miRCURY RT Enzyme Mix	2 µl
Toplam	16 µl

Kullanılan kitin izolasyon prosedürü takip edilmiştir. Buna göre, her PCR tüpüne 16 µl cDNA sentez mix ve 4 µl RNA örneği koyulmuş olup, bir tüpteki hacim 20 µl’dir. Hazırlanan tüpler BIO-RAD C1000 Thermal Cycler’a yerleştirilip Tablo 3’de verilen sıcaklık döngü koşullarında çalıştırılmıştır. Daha sonra örnekler bir gece -20°C’de bekletilmiştir.

Tablo 3. Ters transkripsiyon reaksiyonu sıcaklık döngü koşulları.

BIO-RAD C1000 Thermal Cycler		
Reverse-transcription step	60 min	42 °C
Inactivation of reaction	5 min	95 °C
Storage	forever	4 °C

3. RT-PCR (Ters transkripsiyon reaksiyonu)

miRNA’ların ekspresyon seviyelerinin tespiti, miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) ve QIAGEN Rotor-Gene Q kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda kullanılan kit için önerilen prosedür takip edilmiştir.

Çalışmada hsa-miR-93-5p ve referans miRNA olarak kullanılmıştır. Araştırma amacıyla 10 miRNA’nın ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Bu miRNA’lar; hsa-miR-124-3p, hsa-miR-1273e, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-3622b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 ve hsa-miR-9-5p’dir.

Deney tasarımı, her miRNA için 3 tekrar ve 1 negatif kontrol olarak şekilde (9 x 4 = 36 PCR tüpü) tasarlanmıştır.

-20°C’de bekletilen primerlere 220 µl RNase-free su eklenmiştir. Daha sonra, primerler 20 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kullanılacak cDNA 1/30 dilüsyon olacak şekilde (4 µl cDNA + 116 µl RNase-free water) hazırlanmıştır. Kullanılan PCR reaksiyon mix protokolü Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. PCR reaksiyon mix protokolü

	1 reaksiyon
2x miRCURY SYBR Green	5 µl
Rox Dye	0.5 µl
cDNA template	3 µl
RNase-free water	0.5 µl
Toplam	10 µl

Hazırlanan reaksiyon mix her PCR tüpüne 9 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Her PCR tüpüne 1 µl primer eklenmiştir. Negatif kontrollere primer yerine 1 µl RNase-free su koyularak her tüpteki toplam hacmin 10 µl olması sağlanmıştır. Hazırlanan tüpler QIAGEN Rotor-Gene Q cihazına yerleştirilip Tablo 5’te verilen PCR döngü koşullarında çalıştırılmıştır.

Tablo 5. PCR döngü koşulları.

PCR cycling conditions for miRNA PCR Assays				
Step	Time	Temperature	Ramp Rate	
PCR initial heat activation	2 min	95°	Maximal/fast mode	
2-step cycling:				
Denaturation	10 s	95°C	Maximal/fast mode	
Combined annealing/extension	60 s	56°C	Maximal/fast mode	
The number of cycles:	50*			
Melting curve analysis:	60-95 °C			

* PCR döngü sayısı

4. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen oransal ölçüm düzeyinde değişkenler Ortalama, Ortanca S.Sapma, Min, Mak, olarak, sınıflayıcı ölçüm düzeyinde değişkenler sayı ve yüzde olarak sunulmuştur. Üç grup arasında yaş gruplarının dağılımları Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile, cinsiyet karşılaştırmaları ise ki-kare analizi ile yapılmıştır.

RT-PCR deneylerinden gelen üçer tekrarlı Ct verileri kullanılarak Livak ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) yöntemi (39) ile her miRNA için incelenen koşulda referans miRNA'ların her birine göre kat değişimleri hesaplanmıştır. İstatistiksel değerlendirme; TBC, Sarkoidoz ve kontrol grubunda referans miRNA olarak alınan hsa-miR-22-3p / hsa-miR-93-5p'ye göre ΔC_t verileri hesaplanmıştır. Elde edilen ΔC_t değerleri Kontrol TBC, Kontrol Sarkoidoz gruplarında bağımsız gruplarda t-testi kullanılarak yapılmış ve istatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak iki yönlü anlamlı kabul edilmiştir.

ΔC_t değerlerinde anlamı bulunan miRNA'lar, kontrol TBC ve kontrol Sarkoidoz grubunda klinik tanı testi olarak teşhis yöntemlerinden ve genetik test sonuçlarından yararlanılarak hasta ve sağlıklı bireylerin ayrımının yapılması amaçlanmıştır. Hasta bireyleri sağlıklılardan ne kadar doğrulukla ayırt edebildiğinin bilinmesi çok önemlidir. Tıbbi karar verme sürecinde, testin ayırt ediciliğini belirlemek amacıyla kullanılan yöntemlerden ROC (Receiver Operating Characteristic) analizi (40) kullanılmıştır.

Tanı testinin yeterliliğini değerlendirmek için kullanılan ölçütlerin hesaplanış biçiminin gösterilmesi ve altın standart testle karşılaştırılması sonucu karşılaşılabilecek durumların özetlenmesi Tablo 6'da düzenlenmiş ve ölçütlerin hesaplanışı aşağıda verilmiştir.

Tablo 6. Tanı testini değerlendirirken karşılaşılabilecek durumlar

		Gerçek Durum/(Gold standart)		
		Hasta	Sağlıklı	
Tanı Testi	Hasta	A	B	A+B
	Sağlıklı	C	D	C+D
		A+B	B+D	A+B+C+D

Sensitivite: (Duyarlılık veya Hassasiyet) Testin, gerçek hastalar içinden hastaları ayırma yeteneğidir. Duyarlılık = $A / (A+C) = DP / (DP + YN)$ Özgüllük veya Seçicilik (Specificity) Testin, gerçek sağlıklı kişiler içinden sağlıklıları ayırma yeteneğidir.

Spesifisite Özgüllük = $D / (B + D) = DN / (DN + YP)$ Duyarlılık ve özgüllük oranlarının tersi olan, testin hatalı yargıları da aşağıdaki gibi hesaplanabilir:

Yanlış Pozitif Oranı Gerçek sağlıklı kişiler içinden testin hatalı olarak hasta dediği olgulardır. $YP = (1 - \text{Özgüllük}) = B / (B + D) = YP / (YP + DN)$

Yanlış Negatif Oranı Gerçek hastalar içinden testin hatalı olarak sağlam dediği olgulardır.

$$YN = (1 - \text{Duyarlılık}) = C / (A + C) = YN / (YN + DP)$$

Pozitif Kestirim Değeri Tanı testinin sonucuna göre belirlenen pozitifler içerisindeki doğru pozitiflerin oranıdır. $A / (A + B) = DP / (DP + YP)$

Negatif Kestirim Değeri Tanı testinin sonucuna göre belirlenen negatifler içerisindeki doğru negatiflerin oranıdır. $D / (C + D) = DN / (DN + YN)$

Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) Hastalık tanısı koymanın doğruluk oranıdır. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının, hastalığın yokluğunda pozitif çıkma olasılığına oranıdır. Yani hastalığa var dediği zaman doğruyu bildirmesinin yanlışına oranıdır.

$LR+ = \text{Duyarlılık} / (1 - \text{Seçicilik}) = A(B + D) / B(A + C) = DP(YP + DN) / YP(DP + YN)$ Bu oran ne kadar yüksek olursa, gerçek hastalar o derece iyi ayrımlanmaktadır.

Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, LR-) Sağlam tanısının doğruluk oranıdır. Testin sonucunun hastalığın varlığında negatif çıkma olasılığının, hastalığın yokluğunda negatif çıkma olasılığına oranıdır. $LR- = (1 - \text{Duyarlılık}) / (\text{Seçicilik}) = C(B + D) / D(A + C) = YN(YP + DN) / DN(DP + YN)$. Bu oran ne kadar küçük olursa, gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlanabilmektedir.

Doğruluk (Accuracy): Duyarlılık ve özgüllük birleştirilerek tek bir ölçü elde edilmek istendiğinde kullanılan ölçülerden biri de doğru test sonucu olasılığıdır. Gerçekte testin hasta ve sağlam olarak toplam doğru tanı oranına "doğruluk (accuracy)" olarak hesaplanmaktadır.

IV. BULGULAR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İnsan Etik Kurulu'nun 27.07.2021 tarih ve E-29624016-050.99-364078 sayılı kararı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya 2021-2022 tarihleri arasında, İstanbul Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim dalına başvuran hastalar öğretim üyesi ve tıpta uzmanlık öğrencisi ile beraber tanısal doğruluk açısından değerlendirildikten ve hasta onam formları alındıktan sonra kan örnekleri alınarak başlanmıştır. Çalışmaya 18 TBC, 15 Sarkoidoz ve 20 kişilik kontrol grubu dahil edilmiştir. Tüberküloz, Sarkoidoz hastaları ve kontrol gruplarının bilgileri Tablo 7, 8, 9'da gösterilmiştir.

Tablo 7. Tüberküloz hasta bilgileri

Tüberküloz hasta no	Yaş	Cinsiyet	aside rezistan bakteri	Kültür	Mycobacterium cinsi	Patoloji
T1	53	Erkek	+	+	M.complex	
T2	23	Kadın	+	+	M.complex	
T3	82	Kadın	-	+	M.complex	
T4	26	Erkek	+	+	M.complex	
T5	22	Kadın	-	+	M.complex	kazeifiye granülomatoz
T6	76	Erkek	-	+	M.complex	
T7	24	Kadın	-	+	M.complex	
T8	37	Kadın	-	+	M.complex	
T9	37	Kadın	++	+	M.complex	
T10	46	Erkek	++	+	M.complex	
T11	43	Erkek	++++	+	M.complex	yer yer nekrozlaşan granülomatoz iltihap,yaygın ülserasyon
T12	37	Erkek	+++	+	M.complex	
T13	19	Erkek	+	+	M.complex	
T14	59	Erkek	++	+	M.complex	
T15	24	Erkek	-	+	M.complex	
T16	18	Erkek	-	+	M.complex	
T17	20	Kadın	+++	+	M.complex	
T18	34	Kadın	-	+	M.complex	tbc lenfadenit, ebus ia granülomatöz iltihap

Tablo 8. Sarkoidoz hasta bilgileri

Sarkoidoz hasta no	Yaş	Cinsiyet	ACE	Evre	Quantiferon	PPD	Patoloji
S1	39	Kadın	201	IIA	negatif	2mm	nonnekrotizan granülomatoz iltihap
S2	46	Erkek	87	IIB			non-nekrotizan granulom
S3	57	Erkek	73	IIB			Subkarinal lenf nodu aspirasyonu nonnekrotizan granülomlar
S4	28	Kadın	112	IIB	negatif	0mm	granülom benzeri yapı yapan lenfosit ve histiosit toplulukları
S5	50	Erkek	137	I		0mm	dudak bxden non-nekrotizan granulom
S6	33	Erkek	169	I			tükürük bezi : granülomatoz siyaladenit, nonnekrotizan granülomlar
S7	36	Kadın	105	I			tükürük bezi : 05.2022 granülomatoz siyaladenit, 10.2019 lenf gangliyonu, sol aksilla, tru-cut biyopsi: granülatöz lenfadenit.
S8	59	Kadın	159	IV			lenf gangliyonu, mediasten, 4r kodlu, : non nekrotizan granülatöz lenfadenit.
S9	37	Erkek	69	IIB			fokal nekroz,hyalinizasyon,plazma hücreleri içeren kronik iltihap
S10	46	Kadın	327	III	negatif		tükürük bezi:granülomatoz. Siyaloadenit;bronş-kronik granülomatoz inflamasyon
S11	53	Erkek	86	IV			Granülomatoz inflamasyon
S12	34	Erkek	49	IIB	pozitif		Bronş biyopsi:nonnekrotizan granülomatoz iltihap
S13	58	Kadın	149	IV	negatif	1mm	nonnekrotizan granülomatoz iltihap
S14	55	Kadın	87	III	negatif		nekrotizan granülomatoz lenfadenit
S15	31	Erkek	94	I			nonnekrotizan granülomatoz iltihap

Tablo 9. Kontrol bilgileri

Kontrol no	Yaş	Cinsiyet
K1	42	Erkek
K2	35	Kadın
K3	46	Kadın
K4	50	Erkek
K5	24	Erkek
K6	31	Erkek
K7	41	Kadın
K8	23	Kadın
K9	22	Erkek
K10	23	Kadın
K11	22	Erkek
K12	22	Erkek
K13	23	Erkek
K14	34	Kadın
K15	76	Erkek
K16	45	Kadın
K17	64	Kadın
K18	57	Kadın
K19	58	Kadın
K20	45	Kadın

Çalışma kapsamına alınan kişilerin yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Çalışma kapsamına alınan kişilerin yaş gruplarına göre dağılımları

Yaş	n	Ortalama	S.Sapma	Minimum	Maksimum	Anlamlık
Tbc	18	37,78	19,18	18	82	F=0,70
Sarkoidoz	15	44,13	10,76	28	59	p=0,50
Kontrol	20	39,15	16,06	22	76	

Çalışma kapsamına alınan kişilerin yaş gruplarına göre dağılımları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0,05$)

Çalışma kapsamına alınan kişilerin cinsiyete göre dağılımları Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. Çalışma kapsamına alınan kişilerin cinsiyete göre dağılımları

		Grup			Toplam
Cinsiyet		Tbc	Sarkoidoz	Kontrol	
Erkek	Sayı	10	8	9	27
	Yüzde	55,56	53,33	45,00	50,94
Kadın	Sayı	8	7	11	26
	Yüzde	44,44	46,67	55,00	49,06
	Toplam	18	15	20	53

Çalışma kapsamına alınan kişilerin cinsiyete göre dağılımları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmaya dahil edilen 18 Tüberküloz hastasına ait Ct değerleri Tablo 12’de sunulmuştur.

Tablo 12. Tüberküloz hastalarının Ct değerleri

miRNA ID	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18
miR-124-3p	11,39	37,07	10,90	22,69	36,76	36,25	31,26	28,34	41,67	41,67	36,80	20,99	23,51	26,26	33,02	34,18	32,52	34,68
miR-1273e	37,59	35,43	32,42	37,35	38,99	32,71	41,43	37,76	37,31	33,90	41,69	35,16	35,56	36,57	37,09	37,89	37,74	37,68
miR-155-5p	35,45	35,66	36,53	35,22	37,54	39,45	39,68	37,82	37,87	39,31	37,71	35,88	35,87	37,10	37,79	39,16	38,47	38,41
miR-26b-5p	32,92	30,71	27,93	30,24	33,26	35,18	37,05	35,09	38,23	41,69	35,52	30,18	29,91	31,35	33,65	35,42	36,22	37,69
miR-335-5p	36,51	36,25	32,02	34,08	36,09	33,97	35,13	33,74	34,23	33,41	35,19	34,27	34,11	34,34	34,94	34,52	34,29	34,15
miR-34a-5p	32,41	31,79	30,80	31,11	31,11	35,30	39,36	39,80	37,31	35,49	33,17	31,48	31,11	31,66	33,65	36,48	38,43	38,12
miR-3622b-5p	21,04	13,85	37,75	13,80	17,42	11,82	23,60	39,78	41,36	44,97	39,77	23,43	22,92	20,25	15,18	19,41	28,18	37,49
miR-375	35,15	33,68	33,30	33,76	34,34	34,19	34,27	36,97	31,89	34,49	33,64	33,87	33,55	33,91	34,22	34,95	34,92	34,42
miR-568	38,72	38,12	37,71	36,92	35,13	37,76	38,45	41,36	35,86	39,47	35,40	37,97	37,21	36,60	37,23	37,95	38,95	38,20
miR-9-5p	40,40	40,46	38,52	38,15	38,63	39,30	38,04	42,23	40,68	37,78	37,99	39,55	38,71	38,47	38,90	39,17	40,10	39,96
miR-22-3p	32,25	30,21	27,00	31,88	30,38	30,82	32,53	39,15	16,97	35,63	35,00	29,94	29,72	30,30	30,90	32,58	32,55	30,13
miR-93-5p	24,16	25,50	22,69	25,87	22,98	26,53	26,84	35,06	26,54	28,87	27,17	24,36	24,48	24,22	25,02	26,85	29,55	29,85

Çalışmaya dahil edilen 15 Sarkoidoz hastasının Ct değerleri Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13. Sarkoidoz hastalarının Ct değerleri

miRNA ID	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
miR-124-3p	33,71	31,62	33,13	27,16	29,25	26,64	31,46	23,49	16,06	15,39	14,61	28,35	28,18	26,60	21,75
miR-1273e	27,47	33,44	41,38	40,61	33,46	33,97	37,59	41,26	39,06	33,26	35,48	35,30	34,67	38,11	38,94
miR-155-5p	30,18	35,96	40,79	37,00	37,37	36,28	37,61	13,29	35,04	33,99	32,53	37,17	34,43	29,08	28,02
miR-26b-5p	27,52	29,16	30,05	33,51	33,96	36,78	34,66	36,85	12,94	16,96	14,51	35,22	35,50	33,33	25,73
miR-335-5p	28,31	31,91	36,91	33,00	36,93	38,32	33,82	15,43	33,88	37,25	32,02	36,23	33,70	28,80	28,33
miR-34a-5p	26,92	31,52	35,84	27,30	34,96	29,55	32,63	43,48	33,44	29,09	37,58	30,64	33,18	35,23	36,28
miR-3622b-5p	27,34	29,76	33,47	30,35	35,19	29,43	27,39	16,84	17,34	13,14	13,71	32,31	28,72	23,34	18,83
miR-375	20,65	23,18	23,92	24,81	22,52	16,46	29,23	12,73	26,39	32,05	16,64	21,68	21,83	20,65	23,18
miR-568	25,89	24,51	19,47	13,88	13,83	16,97	20,35	40,70	15,25	10,88	15,82	15,53	20,01	25,89	24,51
miR-9-5p	28,32	28,67	30,27	33,69	33,33	31,76	35,90	16,55	34,05	35,55	31,54	33,16	31,85	28,32	28,67
miR-22-3p	26,11	30,85	34,62	29,88	31,73	37,18	31,43	39,09	38,67	13,54	12,68	33,12	34,02	36,02	34,43
miR-93-5p	20,71	24,23	21,91	23,95	24,35	27,19	25,67	33,36	24,29	14,11	26,01	25,37	26,59	28,42	26,29

Çalışmadaki 20 sağlıklı kontrol grubuna ait Ct değerleri Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo 14. Sağlıklı kontrollerin Ct değerleri

miRNA ID	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20
miR-124-3p	24,13	32,24	33,90	44,62	14,03	29,52	30,27	33,21	41,35	36,48	31,16	23,87	33,05	30,72	30,17	29,34	29,02	34,28	35,61	34,20
miR-1273e	35,89	32,98	39,72	43,43	35,95	38,85	25,06	43,39	44,56	35,59	38,02	19,62	37,83	38,55	38,32	35,97	36,64	38,00	38,24	38,50
miR-155-5p	33,76	35,80	37,72	34,89	37,76	33,54	25,75	41,12	34,73	34,38	36,19	42,08	35,72	36,60	34,90	33,55	34,34	33,69	34,93	36,84
miR-26b-5p	28,08	30,52	33,72	29,43	31,86	27,86	20,43	32,88	18,65	30,67	27,67	27,84	30,62	31,22	29,68	27,65	27,23	25,31	26,13	26,54
miR-335-5p	32,93	34,34	35,22	32,72	40,39	32,47	25,75	34,97	38,02	33,36	33,24	19,62	34,55	35,53	34,22	33,05	32,70	32,85	33,91	33,72
miR-34a-5p	32,74	33,94	35,96	36,97	32,65	31,89	36,21	42,65	28,93	34,38	33,07	39,08	34,99	34,59	34,41	35,19	35,51	35,08	35,29	34,36
miR-3622b-5p	16,56	25,08	24,88	29,97	14,22	15,16	28,66	32,93	39,41	37,94	34,05	32,36	24,12	23,07	21,31	22,59	24,88	30,75	35,51	35,42
miR-375	29,36	29,55	29,48	29,88	28,97	29,54	28,15	33,73	23,57	30,42	28,30	36,01	29,50	29,48	29,33	29,43	29,48	28,72	28,97	29,54
miR-568	30,20	30,37	30,32	31,26	32,35	32,70	31,37	20,99	43,55	27,60	41,49	14,55	30,71	31,21	31,33	31,25	30,32	31,74	32,35	32,70
miR-9-5p	35,17	35,11	36,01	34,83	35,71	34,98	33,89	40,25	34,55	32,93	35,25	31,31	35,25	35,48	35,07	35,24	36,01	35,71	35,71	34,98
miR-22-3p	27,73	31,11	32,49	30,08	31,67	27,71	21,24	33,50	38,87	34,65	16,84	16,38	30,63	30,97	29,56	28,02	29,17	31,00	32,04	29,44
miR-93-5p	22,72	25,42	26,18	24,61	24,36	22,37	19,67	25,73	28,96	23,63	25,93	41,05	24,87	24,95	24,01	22,89	23,16	24,29	24,92	27,38

Çalışma kapsamına alınan kişilere ait ölçülen miRNA değerlerini dağılımları Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15. Çalışma kapsamına alınan kişilere ait ölçülen mi RNA değerlerinin dağılımları

	Kontrol Grubu				TBC				Sarkoidoz			
miRNA	Ortalama	S.sapma	Min	Mak	Ortalama	S.sapma	Min	Mak	ortalama	s,sapma	Min	Mak
hsa-miR-124-3p	31,56	6,38	14,03	44,62	30,00	9,12	10,90	41,67	25,83	6,32	14,61	33,71
hsa-miR-1273e	36,76	5,74	19,62	44,56	36,90	2,49	32,42	41,69	36,27	3,80	27,47	41,38
hsa-miR-155-5p	35,41	3,26	25,75	42,08	37,50	1,45	35,22	39,68	33,25	6,53	13,29	40,79
hsa-miR-26b-5p	28,20	3,73	18,65	33,72	34,01	3,55	27,93	41,69	29,11	8,13	12,94	36,85
hsa-miR-335-5p	33,18	4,19	19,62	40,39	34,51	1,07	32,02	36,51	32,32	5,70	15,43	38,32
hsa-miR-34a-5p	34,89	2,76	28,93	42,65	34,37	3,19	30,80	39,80	33,18	4,33	26,92	43,48
hsa-miR-3622b-5p	27,44	7,44	14,22	39,41	26,22	11,01	11,82	44,97	25,14	7,36	13,14	35,19
hsa-miR-375	29,57	2,30	23,57	36,01	34,20	1,01	31,89	36,97	22,39	4,88	12,73	32,05
hsa-miR-568	30,92	5,91	14,54	43,55	37,72	1,49	35,13	41,36	20,23	7,40	10,88	40,70
hsa-miR-9-5p	35,17	1,63	31,31	40,25	39,28	1,17	37,78	42,23	30,78	4,68	16,55	35,90
hsa-miR-22-3p	29,16	5,46	16,38	38,87	31,00	4,41	16,97	39,15	30,89	7,98	12,68	39,09
hsa-miR-93-5p	25,36	4,18	19,67	41,05	26,47	2,97	22,69	35,06	24,83	4,15	14,11	33,36

Çalışma kapsamına alınan 18 TBC, 15 Sarkoidoz ve 20 kişilik kontrol grubunun göre referans genlere göre ölçülen ΔCt değerleri Tablo 16, 17, 18, 19’da verilmiştir.

Tablo 16. hsa-miR-22-3p housekeeping referans genine göre TBC ve kontrol grubunda ΔCT değerleri

miRNA	Grup	n	Ortalama	S.sapma	Ortanca	t	df	Anlamlılık
hsa-miR-124-3p	Kontrol	20	2,40	6,62	1,82	1,222	36	0,229
	TBC	18	-1,00	10,32	0,79			
hsa-miR-1273e	Kontrol	20	7,60	4,39	7,35	1,161	36	0,253
	TBC	18	5,91	4,59	5,45			
hsa-miR-155-5p	Kontrol	20	6,26	6,24	5,29	-0,135	36	0,893
	TBC	18	6,50	4,42	6,37			
hsa-miR-26b-5p	Kontrol	20	-0,96	6,23	-0,48	-2,101	36	0,043
	TBC	18	3,02	5,32	1,90			
hsa-miR-335-5p	Kontrol	20	4,02	3,64	3,73	0,385	36	0,702
	TBC	18	3,52	4,45	4,03			
hsa-miR-34a-5p	Kontrol	20	5,74	6,63	4,61	1,233	36	0,226
	TBC	18	3,37	5,00	1,56			
hsa-miR-3622b-5p	Kontrol	20	-1,71	8,91	-2,43	0,902	36	0,373
	TBC	18	-4,77	11,94	-7,87			
hsa-miR-375	Kontrol	20	0,42	6,72	-0,22	-1,563	36	0,127
	TBC	18	3,20	3,63	3,35			
hsa-miR-568	Kontrol	20	1,76	7,05	0,95	-2,655	36	0,012
	TBC	18	6,73	3,82	6,37			
hsa-miR-9-5p	Kontrol	20	6,02	5,01	5,13	-1,442	36	0,158
	TBC	18	8,28	4,63	8,16			

df: serbestlik derecesi

hsa-miR-22-3p housekeeping referans genine göre TBC ve kontrol grubunda ΔCt değerleri; hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-568’de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 17. hsa-miR-93-5p housekeeping referans genine göre TBC ve kontrol grubunda ΔC_t değerleri

miRNA	Grup	n	Ortalama	S.sapma	Ortanca	t	df	Anlamlılık
hsa-miR-124-3p	Kontrol	20	6,20	7,88	6,985	1,009	36	0,32
	TBC	18	3,52	8,48	4,625			
hsa-miR-1273e	Kontrol	20	11,40	8,29	13,245	0,462	36	0,647
	TBC	18	10,43	3,45	10,92			
hsa-miR-155-5p	Kontrol	20	10,06	2,96	10,705	-1,051	36	0,3
	TBC	18	11,02	2,65	11,36			
hsa-miR-26b-5p	Kontrol	20	2,84	5,58	4,96	-3,182	36	0,003
	TBC	18	7,54	2,98	8,095			
hsa-miR-335-5p	Kontrol	20	7,82	7,17	9,15	-0,117	36	0,908
	TBC	18	8,04	3,37	8,25			
hsa-miR-34a-5p	Kontrol	20	9,54	4,42	10,07	1,462	36	0,152
	TBC	18	7,89	1,92	8,12			
hsa-miR-3622b-5p	Kontrol	20	2,09	7,10	0,71	0,844	36	0,404
	TBC	18	-0,25	9,90	-2,34			
hsa-miR-375	Kontrol	20	4,22	3,65	4,62	-3,424	36	0,002
	TBC	18	7,72	2,48	7,995			
hsa-miR-568	Kontrol	20	5,56	8,63	7,24	-2,71	36	0,01
	TBC	18	11,25	2,27	11,42			
hsa-miR-9-5p	Kontrol	20	9,82	5,06	10,66	-2,255	36	0,03
	TBC	18	12,81	2,58	13,325			

df: serbestlik derecesi

hsa-miR-93-5p housekeeping referans genine göre sarkoidoz ve kontrol grubunda ΔC_t değerleri hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 ve hsa-miR-9-5p’de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,005$).

Tablo 18. hsa-miR-22-3p housekeeping referans genine göre sarkoidoz ve kontrol grubunda ΔC_t değerleri

miRNA	Grup	n	Ortalama	S.Sapma	Ortanca	t	df	Anlamlılık
hsa-miR-124-3p	Kontrol	20	2,40	6,62	1,82	3,045	33	0,005
	Sarkoidoz	15	-5,06	7,88	-2,72			
hsa-miR-1273e	Kontrol	20	7,60	4,39	7,35	1,13	33	0,267
	Sarkoidoz	15	5,38	7,22	2,18			
hsa-miR-155-5p	Kontrol	20	6,26	6,24	5,29	1,324	33	0,195
	Sarkoidoz	15	2,36	11,07	4,07			
hsa-miR-26b-5p	Kontrol	20	-0,96	6,23	-0,48	0,356	33	0,724
	Sarkoidoz	15	-1,78	7,46	1,41			
hsa-miR-335-5p	Kontrol	20	4,02	3,64	3,73	1,001	33	0,324
	Sarkoidoz	15	1,43	10,83	2,20			
hsa-miR-34a-5p	Kontrol	20	5,74	6,63	4,61	1,386	33	0,175
	Sarkoidoz	15	2,28	8,11	0,81			
hsa-miR-3622b-5p	Kontrol	20	-1,71	8,91	-2,43	1,36	33	0,183
	Sarkoidoz	15	-5,75	8,37	-1,15			
hsa-miR-375	Kontrol	20	0,42	6,72	-0,22	3,079	33	0,004
	Sarkoidoz	15	-8,50	10,39	-10,70			
hsa-miR-568	Kontrol	20	1,76	7,05	0,95	4,803	33	$p < 0,001$
	Sarkoidoz	15	-10,66	8,23	-11,08			
hsa-miR-9-5p	Kontrol	20	6,02	5,01	5,13	2,284	33	0,029
	Sarkoidoz	15	-0,12	10,56	-2,17			

df: serbestlik derecesi

hsa-miR-22-3p housekeeping referans genine göre sarkoidoz ve kontrol grubunda ΔC_t değerleri; hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 ve hsa-miR-9-5p’de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 19. hsa-miR-93-5p housekeeping referans genine göre sarkoidoz ve kontrol grubunda ΔC_t değerleri

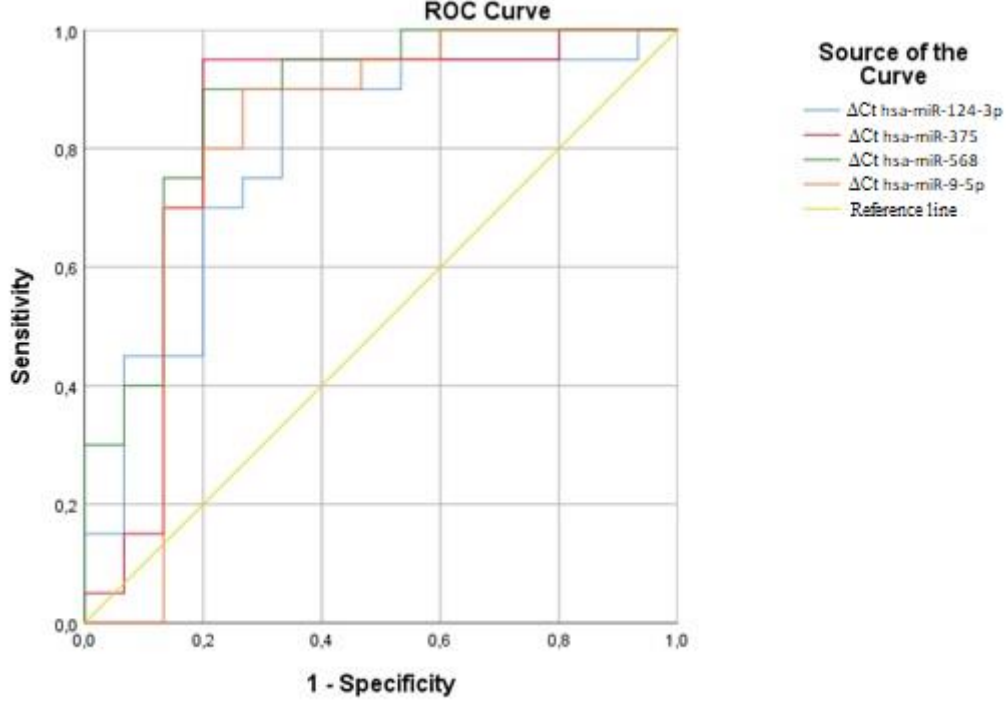
miRNA	Grup	n	Ortalama	S.Sapma	Ortanca	t	df	Anlamlılık
hsa-miR-124-3p	Kontrol	20	6,20	7,88	6,99	2,001	33	0,054
	Sarkoidoz	15	1,00	7,24	1,59			
hsa-miR-1273e	Kontrol	20	11,40	8,29	13,25	-0,015	33	0,988
	Sarkoidoz	15	11,44	4,23	9,69			
hsa-miR-155-5p	Kontrol	20	10,06	2,96	10,71	0,734	33	0,468
	Sarkoidoz	15	8,42	9,43	10,75			
hsa-miR-26b-5p	Kontrol	20	2,84	5,58	4,96	-0,673	33	0,506
	Sarkoidoz	15	4,28	7,07	6,81			
hsa-miR-335-5p	Kontrol	20	7,82	7,17	9,15	0,122	33	0,903
	Sarkoidoz	15	7,49	8,82	8,15			
hsa-miR-34a-5p	Kontrol	20	9,54	4,42	10,07	0,855	33	0,399
	Sarkoidoz	15	8,35	3,59	7,29			
hsa-miR-3622b-5p	Kontrol	20	2,09	7,10	0,71	0,678	33	0,503
	Sarkoidoz	15	0,31	8,37	2,13			
hsa-miR-375	Kontrol	20	4,22	3,65	4,62	3,168	33	0,003
	Sarkoidoz	15	-2,44	8,43	-1,83			
hsa-miR-568	Kontrol	20	5,56	8,63	7,24	3,948	33	$p<0,001$
	Sarkoidoz	15	-4,60	5,73	-5,32			
hsa-miR-9-5p	Kontrol	20	9,82	5,06	10,66	1,761	33	0,087
	Sarkoidoz	15	5,95	7,93	7,61			

df: serbestlik derecesi

Hsa-miR-93-5p housekeeping referans genine göre sarkoidoz ve kontrol grubunda ΔC_t değerleri; hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568’de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

1. Sarkoidoz Roc Analiz Sonuçları

A. Hsa-miR-22-3p referans geni için cut-off değerleri



Şekil 8. ROC eğrisi (Sarkoidozda değerlerin daha düşük olması nedeniyle referans değerleri kontrole göre alınmıştır. Referans kontrol grubu alınmıştır).

Tablo 20. Eğri altında kalan alan değerleri ve anlamlılıkları

Analiz sonucu değişkenler	Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	% 95 Güven Aralığı	
				Alt Sınır	Üst Sınır
hsa-miR-124-3p	,793	,080	,003	,636	,951
hsa-miR-375	,830	,084	,001	,665	,995
hsa-miR-568	,873	,064	,000	,748	,999
hsa-miR-9-5p	,807	,089	,002	,631	,982

Tablo 21. Optimal cut-off değerleri

Pozitiflik sınır değeri ($\geq$)							
		Sensitivite	1 - Spesifisite	Spesifisite	Sen+Spe	LR+	LR-
Δ Ct hsa-miR-124-3p	0,32	0,75	0,27	0,73	1,48	2,78	0,34
	0,95	0,70	0,20	0,80	1,50	3,50	0,38
Δ Ct hsa-miR-375							
	-4,65	0,95	0,20	0,80	1,75	4,75	0,06
	-3,65	0,90	0,20	0,80	1,70	4,50	0,13
	-3,04	0,85	0,20	0,80	1,65	4,25	0,19
Δ Ct hsa-miR-568							
	-2,42	0,90	0,20	0,80	1,70	4,50	0,13
	-2,01	0,85	0,20	0,80	1,65	4,25	0,19
Δ Ct hsa-miR-9-5p							
	2,87	0,90	0,27	0,73	1,63	3,33	0,14
	3,91	0,80	0,20	0,80	1,60	4,00	0,25

Hsa-miR-124-3p Δ Ct 0,32 değerinden düşük olması Sarkoidoz hastalarının %75'ini, kontrollerin %73'ünü ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-124-3p Δ Ct 0,32 değerinde pozitif olabilirlik oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 2,78'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 2,78 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 2,78 kat fazladır. Hsa-miR-124-3p Δ Ct 0,32 değerinde negatif olabilirlik oranı (Negative Likelihood Ratio, LR-) 0,34'dür. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayırt edilebilir.

Hsa-miR-124-3p Δ Ct 0,95 değerinden düşük olması Sarkoidoz hastalarının %70'ini, kontrollerin %80'ini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-124-3p Δ Ct 0,95 değerinde pozitif olabilirlik oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 3,50'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 3,50 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 3,50 kat fazladır. Hsa-miR-124-3p Δ Ct 0,95 değerinde negatif olabilirlik oranı (Negative Likelihood Ratio, LR-) 0,38'dir. 0,95 değerinde LR- değerinin artış gösterdiği gözlemlenmektedir.

Hsa-miR-375 Δ Ct -4,65 değerinden düşük olması sarkoidoz hastalarının % 95'ini, kontrollerin %80'ini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-375 Δ Ct -4,65 değerinde pozitif olabilirlik oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 4,75'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 4,75 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 4,75 kat fazladır. Hsa-miR-375 Δ Ct -4,65 değerinde negatif olabilirlik oranı (Negative Likelihood Ratio, LR-) 0,06'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayırt edilebilir.

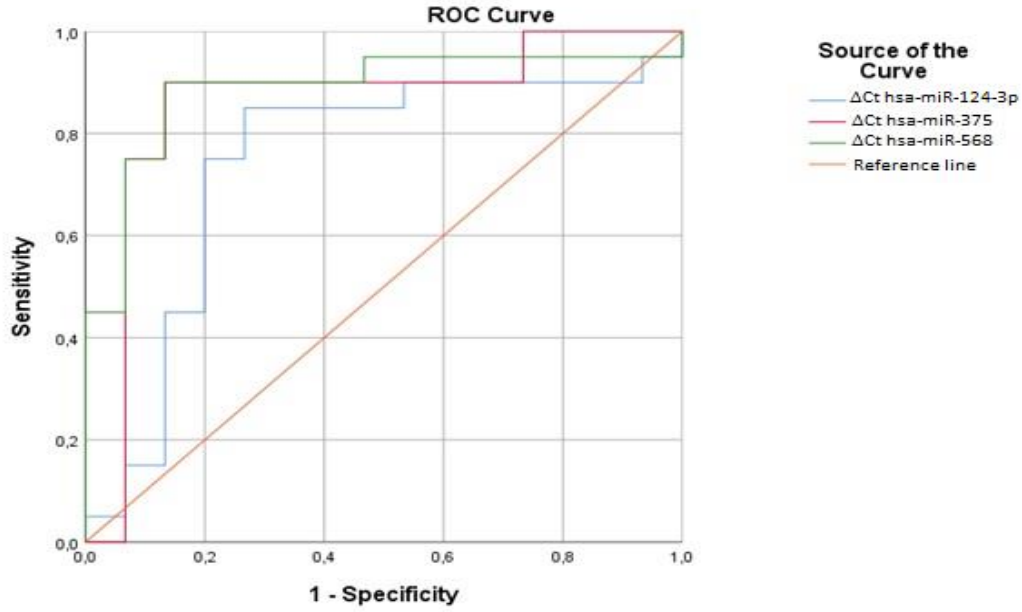
Hsa-miR-375 ΔCt -3,65 değerinde dūřuk olması Sarkoidoz hastalarının % 93'ünü, kontrollerin %80'ini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-375 ΔCt -3,65 değerinde pozitif olabilirlik oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 4,50'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 4,50 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 4,50 kat fazladır. Hsa-miR-375 ΔCt -3,65 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, LR -) 0,13 dır. -3,65 değerinde LR- değerinin artış gösterdiği gözlemlenmektedir.

Hsa-miR-568 ΔCt -2,42 değerinden dūřuk olması Sarkoidoz hastalarının % 90'ini, kontrollerin %80'ini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-568 ΔCt -2,42 değerinde pozitif olabilirlik oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 4,50'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 4,50 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 4,50 kat fazladır. Hsa-miR-568 ΔCt -2,42 değerinde negatif olabilirlik oranı (Negative Likelihood Ratio, LR -) 0,13'dür. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlanabilmektedir.

Hsa-miR-9-5p ΔCt 2,87 değerinden dūřuk olması Sarkoidoz hastalarının % 90'ını, kontrollerin %73'ünü ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-9-5p ΔCt 2,87 değerinde pozitif olabilirlik oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 3,33'dür. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 3,33 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 3,33 kat fazladır. Hsa-miR-9-5p ΔCt 2,87 değerinde negatif olabilirlik oranı (Negative Likelihood Ratio, LR-) 0,14'dür. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayırt edilebilir.

Hsa-miR-9-5p ΔCt 3,91 değerinden dūřuk olması sarkoidoz hastalarının % 90'ını, kontrollerin %73'ünü ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-9-5p ΔCt 3,91 değerinde pozitif olabilirlik oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 4'dür. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 4 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 4 kat fazladır. Hsa-miR-9-5p ΔCt 3,91 değerinde negatif olabilirlik oranı (Negative Likelihood Ratio, LR-) 0,25'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayırt edilebilir.

B. Hsa-miR-93-5p referans geni için cut-off değerleri



Şekil 9. ROC eğrisi (Referans kontrol grubu olarak alınmıştır).

Tablo 22. Eğri altında kalan alan değerleri ve anlamlılıkları

Analiz sonucu değişkenler	Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	% 95 Güven Aralığı	
				Alt Sınır	Üst Sınır
hsa-miR-124-3p	,743	,093	,015	,561	,925
hsa-miR-375	,857	,076	,000	,707	1,000
hsa-miR-568	,887	,062	,000	,766	1,000

Tablo 23. Optimal cut-off değerleri

Pozitiflik sınır değeri ($\geq$)		Sensitivite	1 - Spesifite	Spesifisite	Sen+Spe	LR+	LR-
Hsa-miR-124-3p							
	5,07	0,85	0,27	0,73	1,58	3,15	0,21
	5,78	0,75	0,27	0,73	1,48	2,78	0,34
Hsa-miR-375							
	2,13	0,90	0,13	0,87	1,77	6,92	0,11
	2,27	0,85	0,13	0,87	1,72	6,54	0,17
Hsa-miR-568							
	2,12	0,90	0,13	0,87	1,77	6,92	0,11
	4,06	0,85	0,13	0,87	1,72	6,54	0,17

Hsa-miR-124-3p Δ Ct değeri için 5,07 değerinden düşük olması Sarkoidoz hastalarının % 85'ini, kontrollerin %73'ünü ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-124-3p Δ Ct değeri için 5,07 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 3,15'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 3,15 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 3,15 kat fazladır. Hsa-miR-124-3p Δ Ct değeri için 5,07 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, LR -) 0,21'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlanabilmektedir.

Hsa-miR-124-3p Δ Ct değeri optimal değeri 5,78 olduğu zamanda ise Sarkoidoz hastalarının % 75'ini, kontrollerin %73'ünü ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-124-3p Δ Ct değeri için 5,78 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 2,78'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 2,78 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 2,78 kat fazladır. Hsa-miR-124-3p Δ Ct değeri için 5,78 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, L-) 0,34'dür. 0,34 değerinde LR- artış göstermektedir.

Hsa-miR-375 Δ Ct değeri için 2,13 değerinden düşük olması Sarkoidoz hastalarının % 90'ını, kontrollerin %87'sini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-375 Δ Ct değeri için 2,13 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 6,92'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 6,92 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 6,92 kat fazladır. Hsa-miR-375 değeri için 2,13 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, L -) 0,11'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlaşabilmektedir.

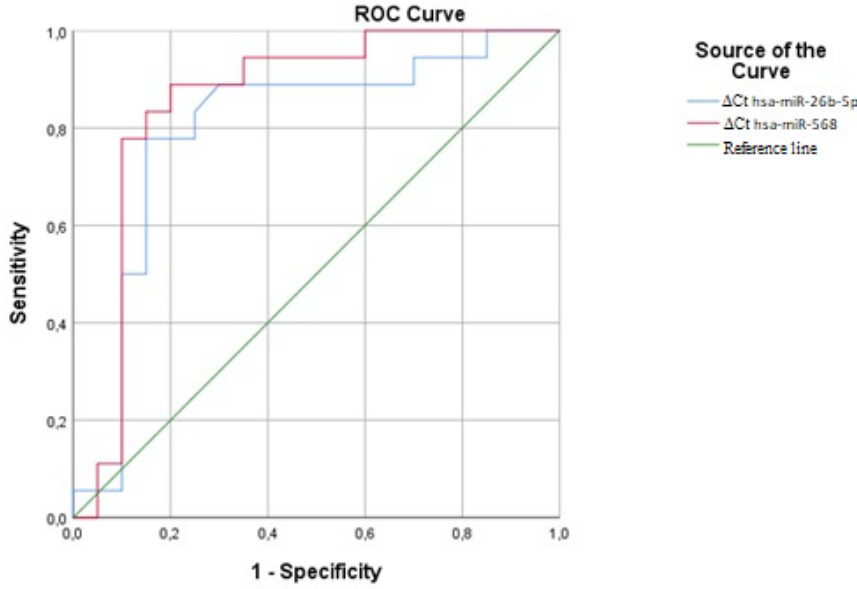
Hsa-miR-375 optimal değeri 2,27 olduğu zamanda ise sarkoidoz hastalarının % 85'ini, kontrollerin %87'sini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-375 Δ Ct değeri için 2,27 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 6,54'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 6,54 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 6,54 kat fazladır. hsa-miR-375 Δ Ct değeri için 2,13 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, L-) 0,17'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlaşabilmektedir.

Hsa-miR-568 Δ Ct 2,12 değerinden düşük olması sarkoidoz hastalarının % 90'ını, kontrollerin %87'sini ayırma gücüne sahiptir. hsa-miR-568 Δ Ct değeri için 2,12 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 6,92'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 6,92 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 6,92 kat fazladır. Hsa-miR-568 Δ Ct değeri için 2,12 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, LR -) 0,11'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlaşabilmektedir.

Hsa-miR-568 ΔCt 4,06 değerinden düşük olması durumunda ise sarkoidoz hastalarının % 85'ini, kontrollerin %87'sini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-568 ΔCt değeri için 4,06 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 6,54'dür. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 6,54 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 6,54 kat fazladır. Hsa-miR-568 ΔCt değeri için 4,06 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, LR -) 0,17'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlaşabilmektedir.

2. Tüberküloz Roc Analiz Sonuçları

A. Hsa-miR-22-3p referans geni için cut-off değerleri



Şekil 10. ROC eğrisi (referans olarak Hsa-miR-22-3p alınmıştır)

Tablo 24. Eğri altında kalan değerler

Analiz sonucu değişkenler	Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	% 95 Güven Aralığı	
				Alt Sınır	Üst Sınır
Hsa-miR-26b-5p	,799	,079	,002	,644	,954
Hsa-miR-568	,856	,069	,000	,720	,991

Tablo 25. Δ Ct Hsa-miR-26b-5p ve Δ Ct Hsa-miR-568 değerlerine göre sensitivite ve spesifisite değerleri

Pozitiflik sınır değeri ($\geq$)							
Hsa-miR-26b-5p		Sensitivite	1 - Spesifite	Spesifisite	Sen+Spe	LR+	LR-
	0,30	0,78	0,20	0,80	1,58	3,90	0,28
	0,43	0,78	0,15	0,85	1,63	5,20	0,26
	0,51	0,72	0,15	0,85	1,57	4,80	0,33
Hsa-miR-568							
	3,55	0,89	0,20	0,80	1,69	4,45	0,14
	4,26	0,83	0,20	0,80	1,63	4,15	0,21
	4,72	0,83	0,15	0,85	1,68	5,53	0,20

Hsa-miR-26b-5p Δ Ct 0,43 değerinden büyük olması TBC hastalarının %78'ini, kontrollerin %85'ini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-26b-5p Δ Ct 0,43 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 5,20'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 5,20 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 5,20 kat fazladır. Hsa-miR-26b-5p Δ Ct 0,43 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, LR-) 0,26'dur. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlanabilmektedir.

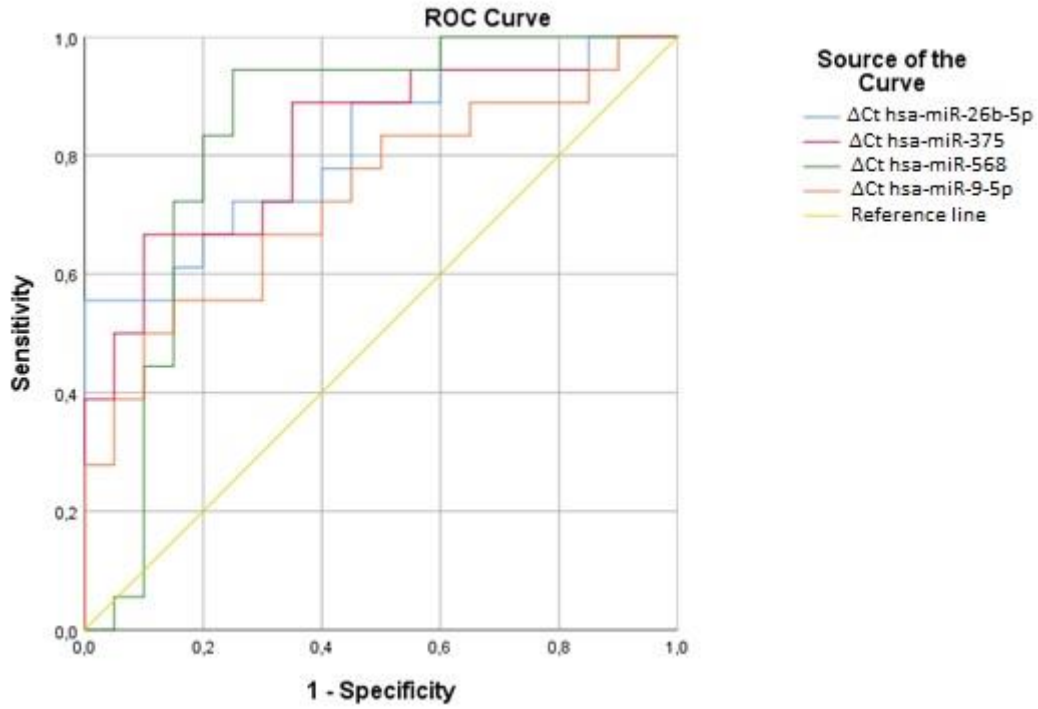
Hsa-miR-568 Δ Ct 3,55 değerinden büyük olması TBC hastalarının % 89'unu, kontrollerin %80'ini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-568 Δ Ct 3,55 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 4,45'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 4,45 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 4,45 kat fazladır. Hsa-miR-568 Δ Ct 3,55 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, LR-) 0,14'dür. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlanabilmektedir. Hsa-miR-568 Δ Ct 4,26 değerinde olması TBC hastalarının % 83'ünü, kontrollerin %80'ini ayırma gücüne sahiptir.

Hsa-miR-568 Δ Ct 4,26 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 4,15'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 4,15 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 4,15 kat fazladır. Hsa-miR-568 Δ Ct 4,26 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, LR-) 0,21'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlanabilmektedir.

Hsa-miR-568 Δ Ct 4,72 değerinin üzerinde olması TBC hastalarının % 83'ünü, kontrollerin %85'ini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-568 Δ Ct 4,72 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 5,53'dür. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 5,53 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 5,53

kat fazladır. Hsa-miR-568 ΔCt 4,72 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, LR-) 0,20'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlanabilmektedir.

B. Hsa-miR-93-5p referans geni için cut-off değerleri



Şekil 11. ROC eğrisi (referans olarak hsa-miR-93-5p alınmıştır)

Tablo 26. Eğri altında kalan değerleri

Analiz sonucu değişkenler	Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	% 95 Güven Aralığı	
				Alt Sınır	Üst Sınır
hsa-miR-26b-5p	,814	,070	,001	,676	,952
hsa-miR-375	,822	,069	,001	,686	,958
hsa-miR-568	,833	,073	,000	,691	,976
hsa-miR-9-5p	,733	,083	,014	,571	,896

Tablo 27. Hsa -miR-26b-5p ve hsa-miR-568 Δ Ct değerlerine göre sensitivite ve spesifisite değerleri

Pozitiflik sınır değeri ($\geq$)							
Hsa-miR-26b-5p		Sensitivite	1 - Spesifisite	Spesifisite	Sen+Spe	LR+	LR-
	5,79	0,72	0,25	0,75	1,47	2,88	0,37
	6,05	0,67	0,25	0,75	1,42	2,68	0,44
	6,47	0,67	0,2	0,8	1,47	3,35	0,41
Hsa-miR-375							
	5,34	0,89	0,35	0,65	1,54	2,54	0,17
	5,36	0,83	0,35	0,65	1,48	2,37	0,26
	5,5	0,78	0,35	0,65	1,43	2,23	0,34
Hsa-miR-568							
	8,11	0,94	0,25	0,75	1,69	3,76	0,08
	8,29	0,89	0,25	0,75	1,64	3,56	0,15
	8,36	0,83	0,25	0,75	1,58	3,32	0,23
Hsa-miR-9-5p							
	11,13	0,72	0,40	0,60	1,32	1,80	0,47
	11,39	0,67	0,35	0,65	1,32	1,91	0,51
	11,85	0,67	0,30	0,70	1,37	2,23	0,47

Hsa-miR-26b-5p Δ Ct 5,79 değerinin üzerinde olması TBC hastalarının %72'sini, kontrollerin %75'ini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-26b-5p Δ Ct 5,79 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı 2,88'dir. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 2,88 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 2,88 kat fazladır. Hsa-miR-26b-5p Δ Ct 5,79 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, LR -) 0,37'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayırt edilmektedir.

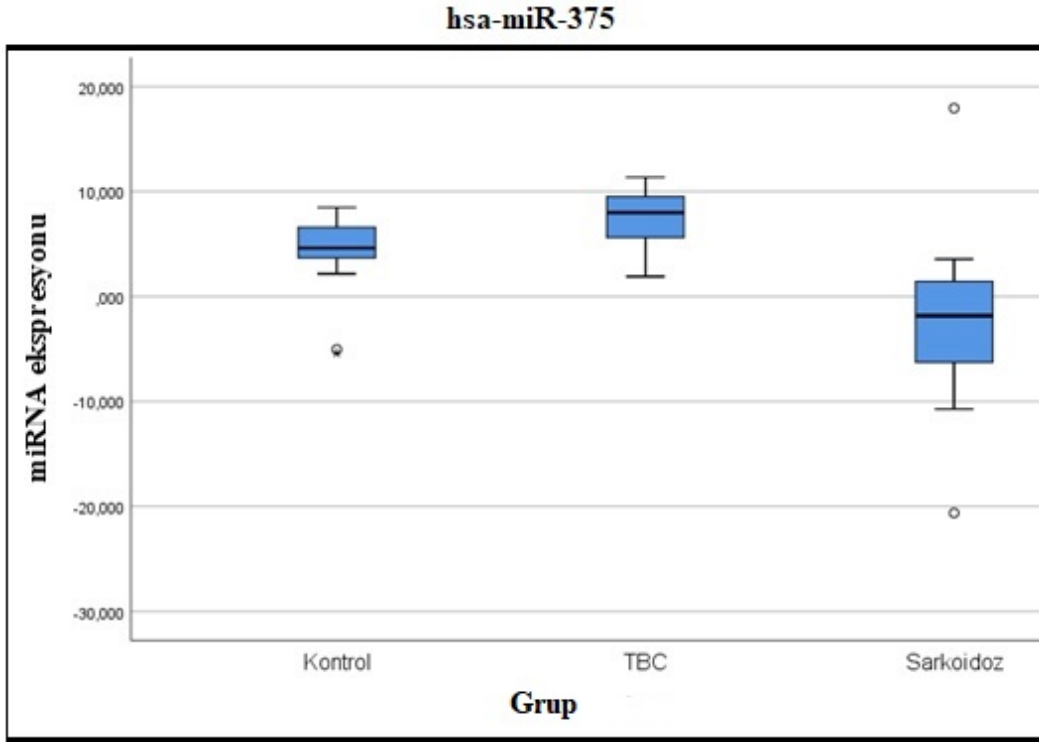
Hsa-miR-375 Δ Ct 5,34 değerinin üzerinde olması TBC hastalarının % 89'unu, kontrollerin %65'ini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-375 Δ Ct 5,34 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 2,54'dür. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 2,54 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 2,54 kat fazladır. Hsa-miR-375 Δ Ct 5,34 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, LR-) 0,17'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayırt edilebilir.

Hsa-miR-568 Δ Ct 8,11 değerinin üzerinde olması TBC hastalarının % 94'ünü, kontrollerin %75'ini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-568 Δ Ct 8,11 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 3,76'dır. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 3,76 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 3,76

kat fazladır. Hsa-miR-568 ΔCt 8,11 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, L -) 0,08'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlanabilmektedir.

Hsa-miR-9-5p ΔCt 11,85 değerinin üzerinde olması TBC hastalarının % 67'sini, kontrollerin %70'ini ayırma gücüne sahiptir. Hsa-miR-9-5p ΔCt 11,85 değerinde Pozitif Olabilirlik Oranı (Positive Likelihood Ratio, LR+) 2,23'dür. Testin sonucunun hastalığın varlığında pozitif çıkma olasılığının 2,23 kat fazladır. Gerçek hastaları tanımlama oranı 2,23 kat fazladır. Hsa-miR-9-5p ΔCt 11,85 değerinde Negatif Olabilirlik Oranı (Negative Likelihood Ratio, L -) 0,47'dir. Gerçek sağlıklı kişiler o kadar iyi ayrımlanabilmektedir.

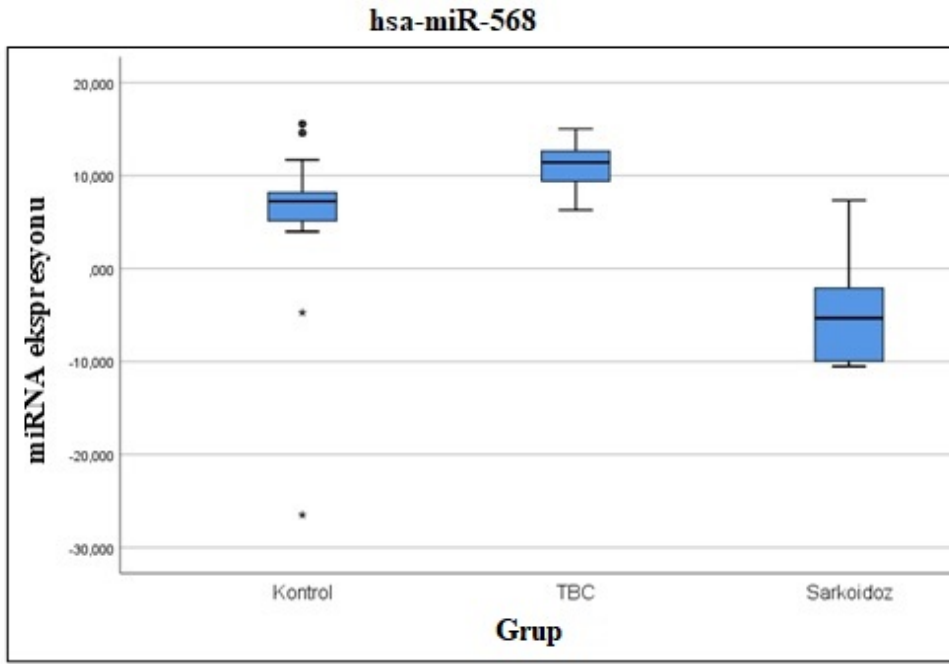
miR-93-5p ve miR-22-3p housekeeping referans genlerine göre Tüberküloz, Sarkoidoz hasta grupları ve kontrol grubundaki hsa-miR-375 ve hsa-miR-568 ekspresyon düzeyleri SPSS programıyla boxplot diyagramı olarak gösterilmiştir (Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14, Şekil 15).



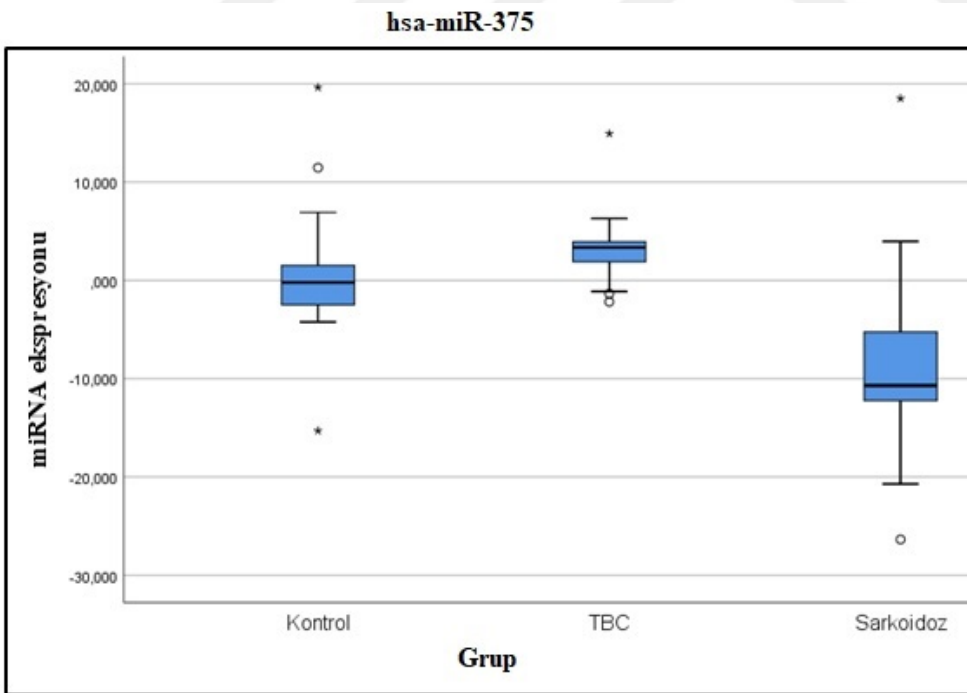
Kantitatif ters transkriptaz-PCR'den bağıl miRNA ekspresyon değerleri y ekseninde gösterilmiştir.

**P değeri < 0,01; *P değeri < 0,05. o: uç değerler

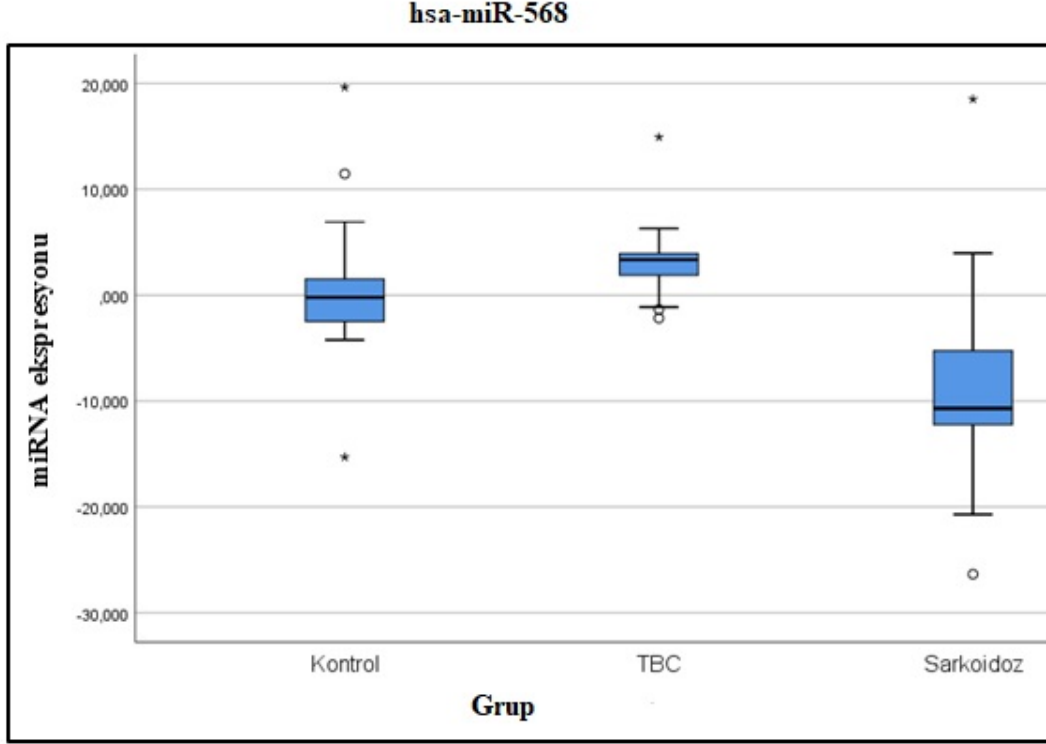
Şekil 12. miR-93-5p'e housekeeping referans genine göre Tüberküloz, Sarkoidoz hasta grupları ve kontrol grubunda miR-375 ekspresyon düzeylerinin boxplot diyagramıyla gösterimi.



Şekil 13. miR-93-5p'e housekeeping referans genine göre Tüberküloz, Sarkoidoz hasta grupları ve kontrol grubunda miR-568 ekspresyon düzeylerinin boxplot diyagramıyla gösterimi.



Şekil 14. miR-22-3p housekeeping referans genine göre Tüberküloz, Sarkoidoz hasta grupları ve kontrol grubunda miR-375 ekspresyon düzeylerinin boxplot diyagramıyla gösterimi.

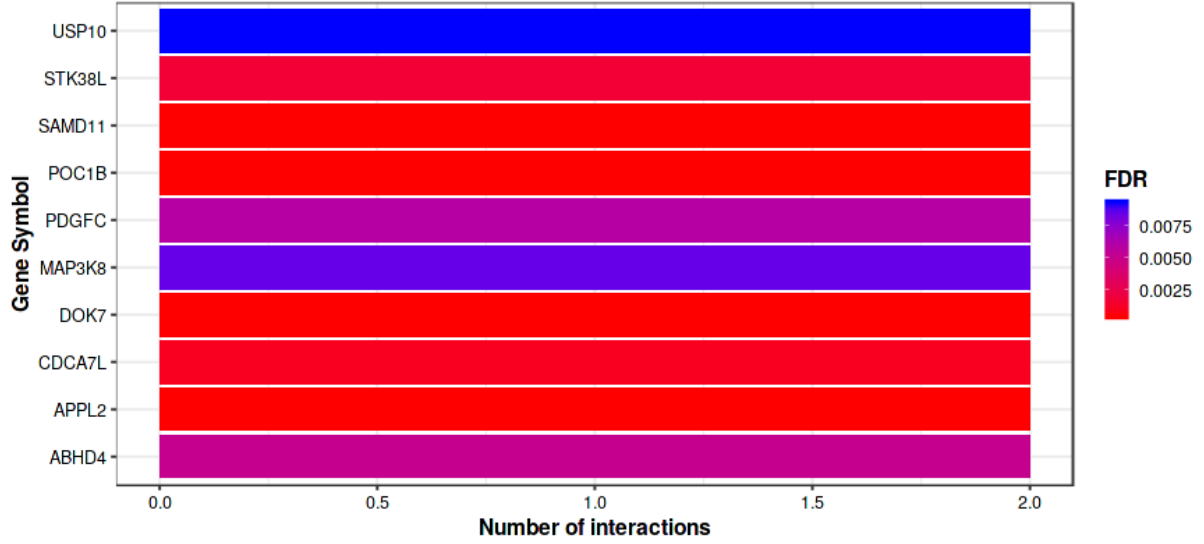


Şekil 15. miR-22-3p housekeeping referans genine göre Tüberküloz, Sarkoidoz hasta grupları ve kontrol grubunda miR- 568 ekspresyon düzeylerinin boxplot diyagramıyla gösterimi.

Mevcut çalışmada, hedef genler ve miRNA'lar arasındaki ilişkileri değerlendirmek için MIENTURNET'in ağ analizi kullanıldı. MIENTURNET çevrimiçi aracı, tüberküloz ve sarkoidozla ilişkili miRNA'ların hangi spesifik genlerle bağlantılı olduklarını belirlemek için kullanıldı. Bu miRNA'ların biyolojik önemi, bir miRNA-mRNA hedef etkileşim ağı oluşturularak ve fonksiyonel zenginleştirme analizi yapılarak belirlendi.

ROC analizi neticesinde Hsa-miR-22-3p referans genine spesifik sarkoidoz hastalığında anlamlı olarak tespit edilen Hsa-miR-124-3p, Hsa-miR-375, Hsa-miR-568, Hsa-miR-9-5p miRNA'larının MIENTURNET miRNA-mRNA hedef etkileşim ağı (miRTarBase) üzerinden etkileşimde oldukları genler belirlendi (Şekil 16) (Tablo 28).

Genom çapında bir veri setindeki binlerce gen, mikrodizi deneylerinde diferansiyel olarak eksprese edilen genleri tespit etmek için bazı boş hipotezlere karşı test edilir. Yanlış Keşif Oranı (FDR) olarak adlandırılan bir dizi gendeki yanlış pozitif genlerin beklenen oranı, bu kümenin istatistiksel önemini ölçmek için önerilmiştir. Mientunet Zenginleştirme sonuçlarına göre Hsa-miR-375 ve Hsa-miR-124-3p'nin 10 genle olan etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 28).



Şekil 16. miRNA-hedef zenginleştirme analizi sonucu

Tablo 28. Mienturnet Zenginleştirme sonuçları (miRTarBase üzerinden)

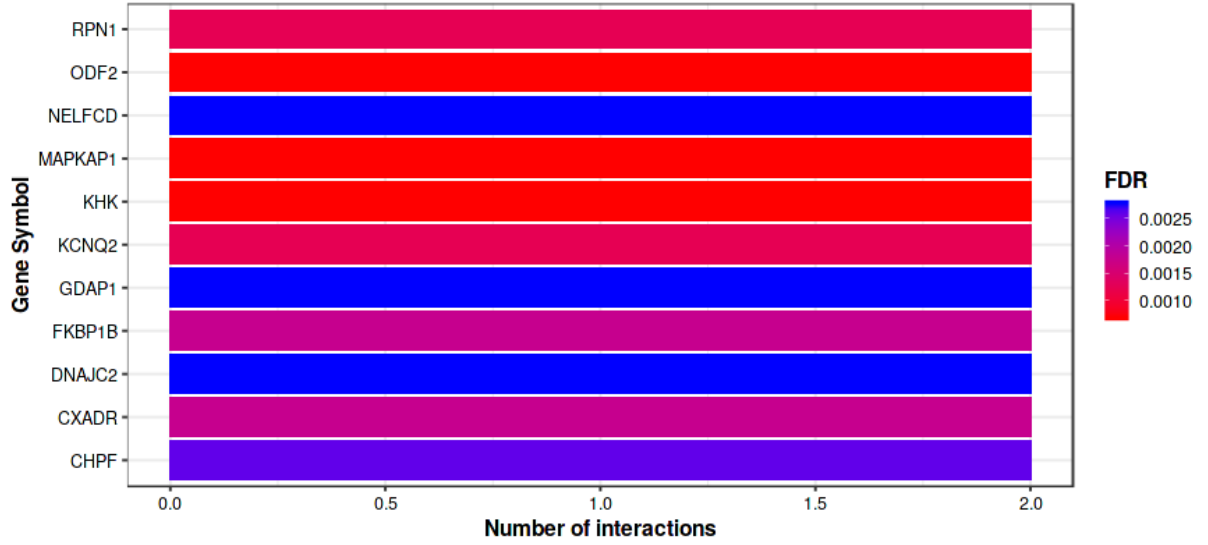
Gene Symbol	p-value	FDR	Odd ratio	Number of interactions	microRNA 1	microRNA 2
APPL2	8.88599008145787e-7	0,0004	0,0012	2	hsa-miR-375	hsa-miR-124-3p
DOK7	8.88599008145787e-7	0,0004	0,0012	2	hsa-miR-375	hsa-miR-124-3p
POC1B	8.88599008145787e-7	0,0004	0,0012	2	hsa-miR-375	hsa-miR-124-3p
SAMD11	8.88599008145787e-7	0,0004	0,0012	2	hsa-miR-375	hsa-miR-124-3p
CDCA7L	2,66511E-06	0,001	0,0017	2	hsa-miR-124-3p	hsa-miR-375
STK38L	5,32886E-06	0,0017	0,0023	2	hsa-miR-375	hsa-miR-124-3p
ABHD4	1,86366E-05	0,0051	0,004	2	hsa-miR-375	hsa-miR-124-3p
PDGFC	2,48424E-05	0,0059	0,0046	2	hsa-miR-375	hsa-miR-124-3p
MAP3K8	3,99048E-05	0,0085	0,0058	2	hsa-miR-375	hsa-miR-124-3p
USP10	4,876E-05	0,0093	0,0063	2	hsa-miR-375	hsa-miR-124-3p

Elde edilen sonuçlara göre; APPL2, DOK7, POC1B, SAMD11, CDCA7L, STK38L, ABHD4 PDGFC, MAP3K8, USP10 genlerinin hsa-miR-375 ve hsa-miR-124-3p ile yüksek etkileşim halinde oldukları tespit edilmiştir (mRNA (gen)-miRNA arasındaki bağlantı yüksek olarak tespit edilmiştir.)

Aynı şekilde ROC analizinde hsa-miR-93-5p referans genine spesifik sarkoidoz hastalığında anlamlı olarak tespit edilen hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 miRNA'larının miRNA-hedef zenginleştirme analiziyle hsa-miR-375 ve hsa-miR-124-3p miRNA'ların APPL2, DOK7, POC1B, SAMD11, CDCA7L, STK38L, ABHD4, PDGFC, MAP3K8, USP10 genleriyle yüksek etkileşim halinde olduğu tespit edilmiştir. Bu genlerden APPL2, PDGFC, MAP3K8 genlerinin sarkoidozla ilişkili olduğu belirlenmiştir.

ROC analizinde hsa-miR-93-5p referans genine spesifik tüberküloz hastalığında anlamlı olarak tespit edilen hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, hsa-miR-9-5p miRNA'larının miRNA-hedef zenginleştirme analiziyle hsa-miR-375 ve hsa-miR-26b-5p'nin KHK, MAPKAP1, ODF2, KCNQ2, RPN1, CXADR, FKBP1B, CHPF, DNAJC2, GDAP1, NELFCD genleriyle yüksek etkileşim halinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 17).

miRTarBase üzerinden elde edilen MIENTURNET Zenginleştirme sonuçları Tablo 29'de verilmiştir. hsa-miR-375 ve hsa-miR-26b-5p miRNA'larının 11 genle olan etkileşimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 17. miRNA-hedef zenginleştirme analizi sonucu

Tablo 29. MIENTURNET Zenginleştirme sonuçları (miRTarBase üzerinden)

Gene Symbol	p-value	FDR	Odd ratio	Number of interactions	microRNA 1	microRNA 2
KHK	8.88599008145787e-7	0,000692219	0,00115429	2	hsa-miR-375	hsa-miR-26b-5p
MAPKAP1	8.88599008145787e-7	0,000692219	0,00115429	2	hsa-miR-375	hsa-miR-26b-5p
ODF2	8.88599008145787e-7	0,000692219	0,00115429	2	hsa-miR-375	hsa-miR-26b-5p
KCNQ2	2,66511E-06	0,001245674	0,001731435	2	hsa-miR-375	hsa-miR-26b-5p
RPN1	2,66511E-06	0,001245674	0,001731435	2	hsa-miR-375	hsa-miR-26b-5p
CXADR	5,32886E-06	0,001779077	0,00230858	2	hsa-miR-375	hsa-miR-26b-5p
FKBP1B	5,32886E-06	0,001779077	0,00230858	2	hsa-miR-375	hsa-miR-26b-5p
CHPF	8,87915E-06	0,002593821	0,002885725	2	hsa-miR-375	hsa-miR-26b-5p
DNAJC2	1,33153E-05	0,002776338	0,00346287	2	hsa-miR-375	hsa-miR-26b-5p
GDAP1	1,33153E-05	0,002776338	0,00346287	2	hsa-miR-375	hsa-miR-26b-5p
NELFCD	1,33153E-05	0,002776338	0,00346287	2	hsa-miR-375	hsa-miR-26b-5p

Bu genler arasında RPN1, CHPF, NELFCD Tüberkülozla ilişkili bulunmuştur.

V. TARTIŞMA

Sarkoidoz etiyolojisi bilinmeyen multisistemik granülomatöz bir hastalıktır. Sarkoidoz tanısı, doku örneklerinde nekrotizan olmayan granülomların histopatolojik gösterimi ile klinik ve radyolojik özelliklerin korelasyonu ile konur. Klinik profil enfeksiyonlar, inflamatuvar hastalıklar ve lenfoid maligniteler dahil olmak üzere diğer granülomatöz hastalıkları taklit edebileceğinden tanı genellikle zordur. Tüberkülozdan ayırım özellikle endemik bölgelerde, semptomatik sarkoidoz için herhangi bir immünsupresan tedavi başlanmadan önce mediastinal tüberkülozun dışlanması gereklidir. Çeşitli mikroarray tabanlı çalışmalar, sarkoidozda miRNA ekspresyonunun sarkoidozun patogenezi etkileyebilecek değişikliklerini vurgulamıştır. Çoğu çalışma, miRNA'ların PBMC'lerde ve BAL'de farklı ekspresyonunu göstermiştir ve bunların spesifik sistemik ve lokal sarkoidoz biyobelirteçleri olarak faydalarını analiz etmiştir. Sağlıklı kontrollere kıyasla sarkoidozlu hastaların PBMC'lerinde miR-15b, miR-27b, miR-192, miR-221, miR-222, miR-130a ve miR-let-7f dahil olmak üzere miRNA'larda ekspresyonda anlamlı bir fark bulunmuştur. Üç miRNA (miR-15b, miR-192 ve miR-221) de sarkoidozlu hastaların BAL'sinde farklı şekilde ifade edilir (bu, PBMC'lerdeki ifadeleriyle örtüşür). MiRNA'ların çoğunun inflamasyon ve apoptozda rolü vardır. Bununla birlikte, miR-15b, miR-221 ve miR-222, tümörjenitede bir role sahiptir ve diğerleri antitümör özelliklere sahiptir. miR-29a, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında sarkoidoz hastalarında aşağı regüle edilir. Bu, miRNA'ların sarkoidozda tanısal biyobelirteçler olarak olası faydasını gösterir (41).

Transkriptomik analiz ile sarkoidozlu hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC'ler) proinflamatuvar sitokinler ve miRNA'larda (miR-34a ve miR-144 olarak) bir upregülasyon rapor edilmiştir. miR-34a'nın sarkoidozda NF- κ B sinyallemede ve T hücrelerinin aktivasyonunda yer alan önemli bir miRNA olduğu öne sürülmüştür. Sarkoidozun bu proinflamatuvar paterni, TB PBMC transkriptomu ile birkaç benzerlik göstermiştir; bu, TB'nin granüosit kemoatraktanların ve aktive edici faktörlerin (MIF, GM-CSF ve VEGF olarak) ve IFN- γ ve IL-12'nin daha yüksek ekspresyonunu sunmasına rağmen, ortak patogenetik yolları düşündürmektedir. Ayrıca, bronkoalveoler lavaj (BAL) yöntemiyle elde edilen alveol boşluğundaki inflamatuvar hücrelerin transkriptomik analizi, inflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde yer alan birkaç miRNA ve mRNA'nın sadece sarkoidoz hastaları ve sağlıklı kontroller arasında değil (sarkoidoz grubunda miR-202 ve miR-204'ün aşağı regülasyonu veya miR146a, miR-150, miR-222, T-bet, CCR2, CCR5, CXCR3, CXCR6, IL2,

IL2RB, IL15RA ve IFN- γ 'nin yukarı regülasyonu dahil), aynı zamanda farklı klinik seyir gösteren sarkoidoz hastaları arasında da farklı şekilde eksprese edildiğini ortaya koymuştur (miR-155 ve let-7c'nin kendiliğinden gerileyen hastalarla karşılaştırıldığında ilerleyen vakalarda upregülasyonu olarak) (42).

miR-150 potansiyel olarak NOTCH3 yoluyla CD3+CD4+ T hücrelerinin aktivasyonu ile ilişkilidir, miR-146a ise NF- κ B aktivasyonu ayarında TNF- α ve IL-1 β nedeniyle artan ekspresyonu göz önüne alındığında muhtemelen inhibitördür. MiR-27b, miR-192 ve miR-221 gibi anjiyogenez ve inflamasyon ile ilgili diğer miRNA'ların, sadece torasik adenopatiye kıyasla parankim tutulumu olan sarkoidozda yükseldiği tespit edilmiştir. miR-16 ve miR-20a ekspresyonu ise akciğer hacim kısıtlaması olan hastalarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Mikro-RNA'lar miR-33 ve miR-34'ün de sırasıyla sarkoidoz BAL ve PBMC'lerde arttığı gösterilmiştir; miR-33, bir lipid taşıyıcı düzenleyici ile ilgilidir ve miR-34, IFN- γ düzenlemesinde yer alır (43).

Çalışmamızda qRT-PCR yöntemiyle yapılan analizler neticesinde, Sarkoidoz hastalarında hsa-miR-22-3p referans miRNA'sına göre dört plazma miRNA'sı (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 hsa-miR-9-5p) arasında anlamlı fark gösterirken, hsa-miR-93-5p referans miRNA'sına göre ise üç plazma miRNA'sı (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568) anlamlı fark göstermiştir. ROC analiz sonuçlarına göre; sarkoidozlu hastalarda (hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 hsa-miR-9-5p miRNA'ların downregüle (aşağı regüle) olduğu tespit edilmiştir. İki referans miRNA'sına göre hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 miRNA'ları ortak olarak anlamlı bulunmuştur.

Tüberküloz hastalarında ise, ROC analiziyle, hsa-miR-22-3p referans miRNA'sına göre iki plazma miRNA'sı (hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-568) anlamlı fark göstermektedir. hsa-miR-93-5p referans miRNA'sına göre ise dört plazma miRNA'sı (hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, hsa-miR-9-5p) anlamlı bulunmuştur. ROC analiz sonuçlarına göre; tüberkülozlu hastalarda hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-568, hsa-miR-9-5p miRNA'ların upregüle (yukarı regüle) olduğu tespit edilmiştir. İki referans miRNA'sına göre hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-568 miRNA'ları ortak olarak anlamlı olarak belirlenmiştir.

Fu ve arkadaşları, Gerçek zamanlı kantitatif PCR doğrulamasının ardından mikroarray tabanlı ekspresyon profili kullanarak, aktif akciğer tüberkülozu olan hastalar ve eşleştirilmiş sağlıklı kontroller arasında dolaşımdaki miRNA'ların seviyeleri karşılaştırmışlardır (44). Elde ettikleri sonuçlara göre miR-375'in TB plazmasında 21.4 kat artış gösterdiği ve miR-375'in patojen-konak etkileşimlerinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (44).miR-375 ekspresyon düzeylerindeki belirgin artış, miR-375'in TB enfeksiyonunda önemli role sahip

olduğunu ve TB enfeksiyonundaki işlevlerini doğrulamak için miR-375'in moleküler biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Sarkoidoz ve tüberküloz hasta gruplarında hsa-miR-568 ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız özgün bir çalışma olup, hsa-miR-568 sarkoidoz ve tüberküloz ayırıcı tanısında literatüre önemli katkı sağlayacaktır. Çalışmamız neticesinde, hsa-miR-568'in tanısal değerinin olabileceğinin ilk kez gösterilmesi bu iki hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında yol gösterici olabilecektir.

Plazmadan elde edilen 10 miRNA arasından hsa-miR-375 ve hsa-miR-568 miRNA'ların, deneysel olarak seçilen sarkoidozlu bireylerde ekspresyon düzeylerinde azalma gözlenirken tüberkülozlu bireylerin ekspresyon düzeylerinden artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen sarkoidoz ve tüberküloz hasta gruplarında ortak olarak anlamlı olduğu tespit edilen hsa-miR-375 ve hsa-miR-568 miRNA'ları sarkoidoz ve tüberküloz ayırıcı tanısında kullanılabilir.

Sarkoidoz hastalarında anlamlı olarak tespit ettiğimiz hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 miRNA'larının miRNA-hedef zenginleştirme analiziyle hsa-miR-375 ve hsa-miR-124-3p miRNA'ların APPL2, DOK7, POC1B, SAMD11, CDCA7L, STK38L, ABHD4, PDGFC, MAP3K8, USP10 genleriyle yüksek etkileşim halinde olduğu belirlendi. Bu genlerden APPL2, PDGFC, MAP3K8 genlerinin sarkoidozla ilişkili olduğu tespit edildi.

Sarkoidoz, çevresel ve/veya enfeksiyöz ve/veya genetik faktörlerin neden olduğu bir inflamatuvar sürecin ayırt edici özelliği olan granülomların gelişmesi ve birikmesi ile karakterize edilen bir multisistem hastalığıdır. Bu otoinflamatuvar hastalık esas olarak çevresel saldırılara ve viral enfeksiyonlara açılan kapı olan akciğerleri etkilemektedir. Daha önce, ailesel vakalarda meydana gelen sarkoidoza genetik yatkınlığın, geniş bir patojenik varyant yelpazesi ile ilişkili olduğunu, ancak mTOR (memeli Rapamisin Hedefi) ile ilgili yollar ve otofaji düzenlemesi etrafında bir kümelenme ile bağlantılı olduğunu ve APPL2 (adaptör proteini, PH alanı ve lösin fermuarı 2 ile etkileşime giren fosfotirozin) geninde varyasyonun gözlemlendiği belirlenmiştir (45). Sarkoidozlu hastalarda anormal granülom oluşumunun altında yatan mekanizmalar karışıktır ve tam olarak anlaşılamamıştır. Sarkoidozlu hastalarda hastalığa neden olduğu varsayılan mikobakteriyel antijenlere yanıt olarak granülom oluşumunun moleküler mekanizmalarını belirlemek için yeni bir in vitro insan granülom modeli kullanılmıştır. Aktif sarkoidozlu hastalardan ve normal, hastalısız kontrol gruplarından alınan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC'ler), saflaştırılmış protein türevi kaplı polistiren boncuklarla 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Gen ifadesinin yolak analizi, IL-13'ün sarkoidoz granümatöz yanıtının bir aracısı olduğunu tanımlamakta ve PPD testinden 7 gün sonra sarkoidozlu hastalardan kontrol

gruplarına göre PBMC'lerde en fazla temsil edilen gen ağının IL-13 ve IL-1 β tarafından güçlü bir şekilde düzenlendiği ve IL-13 ve IL-1 β 'in PDGFC ve diğer bir takım büyüme faktörleri ve enzimlerle iş birliği içinde fonksiyon gösterdiği tespit edilmiştir (46).

Batı Afrika soyları, sarkoidoz için Avrupa soylarından daha yüksek bir risk taşımaktadır. Karışım haritalaması, hastalık riskindeki bu tür etnik çeşitliliğin altında yatan genleri bulmak için en doğrudan yöntemi sağlamaktadır. MAP3K8 (Mitojenle aktive olan protein kinaz 8), bağışıklık tepkisinde yer alan genlerin ana düzenleyicisi olan nükleer faktör kappa B üretimini aktive ettiği bilinen bir gendir. Sarkoidoz hastalığının riskinde etnik çeşitliliğin altında yatan genler arasında MAP3K8 geni de yer almaktadır (47).

Çalışmamızda, tüberküloz hastalarında miRNA-hedef zenginleştirme analiziyle anlamlı olarak tespit edilen hsa-miR-375 ve hsa-miR-26b-5p'nin KHK, MAPKAP1, ODF2, KCNQ2, RPN1, CXADR, FKBP1B, CHPF, DNAJC2, GDAP1, NELFCD genleriyle yüksek etkileşim halinde olduğu belirlendi. Bu genlerden RPN1, CHPF, NELFCD genlerinin tüberkülozla ilişkili olarak tespit edildi.

Ökaryotik hücrelerde, 26S proteazom, sitozol ve çekirdekteki protein substratlarının ATP'ye bağımlı devrinden sorumludur. Poliubikuitin zincirleri ile hedef proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonundan sorumlu E1, E2, E3 enzim kaskadı ile birlikte, bu işe alma ve bozunma yolu, ubikuitin-proteazom sistemi (UPS) olarak adlandırılır. Pup-proteazom sistemi (PPS), bu bozunma yolunun bakteriyel fonksiyonel analogunu temsil eder. AAA açılmaz Mpa ve bakteriyel CP, sırasıyla ökaryotik düzenleyici ATPaz alt birimlerine (Rpts) ve ökaryotik 20S'ye homoloji gösterir. Tersine, bakteriyel ubikuitin benzeri hedefleme yakınsak evrimin bir örneğidir ve ne Pup ve ubikuitin ne de Pup ligaz ve E1, E2, E3 kaskadı homolog değildir. Ayrıca, bakteriyel proteazomal açılmaz Mpa, ubikuitin reseptörleri Rpn1, Rpn10 ve Rpn13'ün poliubikuitin etiketini bağladığı ökaryotik 19S parçacığında olduğu gibi, substrat alımı için ek ATPaz olmayan alt birimlerle bağlantıya sahip değildir (48).

MtrA, öncelikle M. tuberculosis ve C.glutamicum'da incelenmiş ve bu organizmalarda farklı ancak kritik roller sergilemiştir. Birkaç bld geni (bldG, bldH, bldM ve bldN), whi geni (whiB, whiD, whiG ve whiH), chp geni (chpH, chpE, chpG, chpF, chpG ve chpD), rdlAB ve sapB Chip-Seq analizinde orta ila düşük düzeylerde zenginleştirme gösterdiği belirlenmiştir. Bu genlerin, S. venezuelae'de potansiyel MtrA hedefleri olduğunu belirtilmiş ve S. coelicolor için in vitro bulgularının çoğuyla tutarlı olduğu tespit edilmiştir (49).

Yapılan çalışmalar, CTSZ'nin nörodejeneratif bozukluklar, Huntington hastalığı ve diğer poliglutamin hastalıkları, multipl skleroz ve mide ve prostat kanseri gelişiminde rol oynadığını göstermiştir; ayrıca, bu gendeki varyantlar tüberküloza yatkınlık ile ilişkilidir. NELFCD/CTSZ

lokuslarından seçilen etiketleme SNP'lerini kullanan yüksek yoğunluklu ilişkilendirme eşlemesinde, CTSZ'nin bir intronik bölgesinde bulunan SNP rs163800, Bonferroni düzeltmesinden sonra bile önemli bir ilişkilendirme sergilemiştir (50).

Ortak hsa-miR-124-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-568 miRNA'lar sarkoidoz hastalarında immün ve alerjik sistemlerde anahtar düzenleyici rollere sahip olabilir. Bulgular ayrıca bu miRNA'ların sarkoidozda potansiyel terapötik hedefler olma olasılığına ışık tutmuştur.

miRNA'lar-gen düzenleyici ağlar sayesinde, tespit edilen hsa-miR-375 ve hsa-miR-124-3p miRNA'ların bağışıklık yollarında yer alan APPL2, PDGFC, MAP3K8 hedef genleri düzenleyebileceğini ve sarkoidozun patogeneze katılabileceğini belirledik. Elde edilen hsa-miR-375 ve hsa-miR-26b-5p miRNA'ları tarafından hedeflendiği tahmin edilen genlerin analizi, RPN1, CHPF, NELFCD genlerin TB ile ilişkili olduğunu ve kodlanan proteinlerin çoğunun, patogenezi aydınlatmak için yararlı olan Mtb enfeksiyonuna karşı sinyal yollarına dahil olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlar, miRNA'ların, sinyal yolları ile Mtb enfeksiyonunu düzenleyebileceğini ve iki miRNA'nın (hsa-miR-26b-5p hsa-miR-568), TB tanısı için potansiyel biyobelirteçler olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. Hem sarkoidoz hem de tüberküloz ayırıcı tanısında fizyolojik ve patolojik süreçlerde hsa-miR-375 ve hsa-miR-568 miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılabileceği görüşündeyiz.

Sonuç olarak bu çalışmada sarkoidoz ve tüberküloz hastalarının kan plazmalarından miRNA ekspresyon spektrumunun incelenmesi bu hastalıkların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmuştur. hsa-miR-22-3p ve hsa-miR-93-5p iki referans miRNA kullanılarak deneylerde üçer tekrar olacak şekilde veri seti oluşturulmuştur. Araştırmalarımız, hsa-miR-375 ve hsa-miR-568'in sarkoidoz ve tüberküloz tanısında biyobelirteç olarak kullanılma potansiyellerini artıran verilere ulaşmamızı sağlamaktadır.

Bu çalışma, sarkoidoz hastalarının her evresindeki hastaların dahil edildiği bir çalışma olduğundan, elde ettiğimiz sonuçlar bu hastalığın tüm sürecini yansıtmaktadır. hsa-miR-375 ve hsa-miR-568 ile ilişkili genlerin MIENTURNET analiziyle belirlenmesi, sarkoidoz ve tüberkülozun moleküler patogenezindeki kritik yolları ve işlevsel mekanizmaları ortaya çıkarmamıza yardımcı olacaktır. Bu analiz, gen düzeyindeki etkileşimleri ve moleküler ağları anlamamızı sağlayarak, bu hastalıkların altında yatan biyolojik süreçleri daha iyi anlamamızı sağlayacaktır.

Bu çalışma ayrıca, tüberküloz ve sarkoidozda aynı miRNA'ların etkili olduğunu, ancak mekanizmalarının birbirine zıt yönde (tüberkülozda upregüle, sarkoidozda downregüle olarak)

etki ettiğini göstermektedir. Bu bulgular, miRNA'ların bu hastalıklardaki açma/kapama anahtar sinyallerinden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Diferansiyel olarak ifade edilen bu miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımı planlandığında, henüz tam olarak anlaşılamamış olan bu iki hastalığın teşhisinde kolaylık sağlayacak ve tedavi süreçlerinin ve seçeneklerinin doğru yerde ve doğru zamanda planlanmasına olanak tanıyacaktır. Bu veriler, miRNA düzeyindeki farklı düzenlemelerin, tüberküloz ve sarkoidozun moleküler patogenezindeki temel farklılıkları yansıttığını ve potansiyel olarak hastalıkların mekanizmalarının anlaşılmasına ve hedeflenmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Tablo 30. Sarkoidoz hastalarında miRNA'lar üzerinden tanı yüzdeleri

Hedef miRNA'lar	Δ Ct sınır değeri	Tanı yüzdesi (%)
Hsa-miR-375	2,13	90
Hsa-miR-568	2,12	90

Sarkoidoz hastalarında downregüle hsa-miR-375 için tanı oranı %90 iken downregüle hsa-miR-568 için de tanı oranı %90 olarak tespit edildi (Tablo 30).

Tablo 31. Tüberküloz hastalarında miRNA'lar üzerinden tanı yüzdeleri

Hedef miRNA'lar	Δ Ct sınır değeri	Tanı yüzdesi (%)
Hsa-miR-375	5,34	89
Hsa-miR-568	8,11	94

Tüberküloz hastalarında ise upregüle hsa-miR-375 için tanı oranı %89 bulunurken hsa-miR-568 için tanı oranı %94 olarak bulundu (Tablo 31).

Sonuç olarak, bu çalışma, tüberküloz ve sarkoidozda farklı düzeylerde etkili olan miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımını planlamak için önemli bir adım oluştururken, bu hastalıkların mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

VI. KAYNAKLAR

1. Li Y, Yin Z, Fan J, Zhang S, Yang W. *The roles of exosomal miRNAs and lncRNAs in lung diseases*. Signal Transduct Target Ther. 2019; 4:47.
2. Dyskova T, Fillerova R, Novosad T, Kudelka M, Zurkova M, Gajdos P, et al. *Correlation Network Analysis Reveals Relationships between MicroRNAs, Transcription Factor T-bet, and Deregulated Cytokine/Chemokine-Receptor Network in Pulmonary Sarcoidosis*. Mediators Inflamm. 2015; 2015: 121378.
3. Zhao Z, Hao J, Li X, Chen Y, Qi X. *MIR-21-5p regulates mycobacterial survival and inflammatory responses by targeting Bcl-2 and TLR4 in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages*. FEBS Lett. 2019; 593 (12):1326-35.
4. Korma W, Mihret A, Tarekegn A, Chang Y, Hwang D, Tessema TS, et al. *Identification of Circulating miR-22-3p and miR-93-5p as Stable Endogenous Control in Tuberculosis Study*. Diagnostics (Basel). 2020; **10** (11).
5. Sinigaglia A, Peta E, Riccetti S, Venkateswaran S, Manganelli R, Barzon L. *Tuberculosis-Associated MicroRNAs: From Pathogenesis to Disease Biomarkers*. Cells. 2020; **9**(10).
6. Wagh V, Urhekar A, Modi D. *Levels of microRNA miR-16 and miR-155 are altered in serum of patients with tuberculosis and associate with responses to therapy*. Tuberculosis (Edinb). 2017; 102: 24-30.
7. Barry SE, Ellis M, Yang Y, Guan G, Wang X, Britton WJ, et al. *Identification of a plasma microRNA profile in untreated pulmonary tuberculosis patients that is modulated by anti-mycobacterial therapy*. J Infect. 2018; **77**(4):341-8.
8. <Tuberkuloz_Tani_ve_Tedavi_Rehberi.pdf>.
9. Acharya B, Acharya A, Gautam S, Ghimire SP, Mishra G, Parajuli N, et al. *Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Biol Rep. 2020; **47**(5):4065-75.
10. Gressens SB, Billard-Pomares T, Leboite H, Cruaud P, Bouchaud O, Carbonnelle E, et al. *Pulmonary tuberculosis: Evaluation of current diagnostic strategy*. Infect Dis Now. 2021; **51**(3):273-8.

11. Gopalaswamy R, Shanmugam S, Mondal R, Subbian S. *Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections - a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment*. J Biomed Sci. 2020; **27**(1):74.
12. Sia JK, Rengarajan J. *Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections*. Microbiol Spectr. 2019; 7(4).
13. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence*. Clin Microbiol Rev. 2003; **16**(3):463-96.
14. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. *The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus*. J Prev Med Hyg. 2017; **58**(1): E9-E12.
15. Pai M. *Tuberculosis: the story after the Primer*. Nat Rev Dis Primers. 2020; **6**(1):29.
16. Maison DP. *Tuberculosis pathophysiology and anti-VEGF intervention*. J Clin Tuberc Other Mycobact Dis. 2022; 27:100300.
17. Barr DA, Lewis JM, Feasey N, Schutz C, Kerkhoff AD, Jacob ST, et al. *Mycobacterium tuberculosis bloodstream infection prevalence, diagnosis, and mortality risk in seriously ill adults with HIV: a systematic review and meta-analysis of individual patient data*. Lancet Infect Dis. 2020; **20**(6):742-52.
18. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. *Tuberculosis*. Nat Rev Dis Primers. 2016; 2:16076.
19. Seve P, Pacheco Y, Durupt F, Jamilloux Y, Gerfaud-Valentin M, Isaac S, et al. *Sarcoidosis: A Clinical Overview from Symptoms to Diagnosis*. Cells. 2021; **10**(4).
20. Sakthivel P, Bruder D. *Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis*. Curr Opin Hematol. 2017; **24**(1):59-65.
21. Ungprasert P, Ryu JH, Matteson EL. *Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment of Sarcoidosis*. Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes. 2019; **3**(3):358-75.
22. Llanos O, Hamzeh N. *Sarcoidosis*. Med Clin North Am. 2019; **103**(3):527-34.
23. Rahaghi FF, Sweiss NJ, Saketkoo LA, Scholand MB, Barney JB, Gerke AK, et al. *Management of repository corticotrophin injection therapy for pulmonary sarcoidosis: a Delphi study*. Eur Respir Rev. 2020; **29**(155).
24. Kirkil G, Lower EE, Baughman RP. *Predictors of Mortality in Pulmonary Sarcoidosis*. Chest. 2018; **153**(1):105-13.

25. Baughman RP, Scholand MB, Rahaghi FF. *Clinical phenotyping: role in treatment decisions in sarcoidosis*. Eur Respir Rev. 2020; **29**(155).
26. Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA, Rossman MD, Yeager H, Jr., Bresnitz EA, et al. *Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis*. Am J Respir Crit Care Med. 2001; **164**(10 Pt 1):1885-9.
27. Scadding JG. *Prognosis of intrathoracic sarcoidosis in England. A review of 136 cases after five years' observation*. Br Med J. 1961; **2**(5261):1165-72.
28. Crouser ED, Maier LA, Wilson KC, Bonham CA, Morgenthau AS, Patterson KC, et al. *Diagnosis and Detection of Sarcoidosis. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline*. Am J Respir Crit Care Med. 2020; **201**(8): e26-e51.
29. Polverino F, Balestro E, Spagnolo P. *Clinical Presentations, Pathogenesis, and Therapy of Sarcoidosis: State of the Art*. J Clin Med. 2020; **9**(8).
30. Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. *Sarcoidosis*. N Engl J Med. 2007; **357**(21):2153-65.
31. Gerke AK, Hunninghake G. *The immunology of sarcoidosis*. Clin Chest Med. 2008; **29**(3): 379-90, vii.
32. Lu TX, Rothenberg ME. *MicroRNA*. J Allergy Clin Immunol. 2018; **141**(4):1202-7.
33. Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. *Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing*. Int J Mol Sci. 2019; **20**(24).
34. Alipoor SD, Adcock IM, Tabarsi P, Folkerts G, Mortaz E. *MiRNAs in tuberculosis: Their decisive role in the fate of TB*. Eur J Pharmacol. 2020; 886:173529.
35. Novosadova E, Chabronova A, Kolek V, Petrek M, Navratilova Z. *The Serum Expression of Selected miRNAs in Pulmonary Sarcoidosis with/without Lofgren's Syndrome*. Mediators Inflamm. 2016:1246129.
36. Bak M, Jazwa A, Kasper L, Kachamakova-Trojanowska N, Jozkowicz A, Sladek K, et al. *Involvement of microRNAs in the inflammatory pathways of pulmonary sarcoidosis*. J Physiol Pharmacol. 2015; **66**(5):635-42.
37. Chandan K, Gupta M, Sarwat M. *Role of Host and Pathogen-Derived MicroRNAs in Immune Regulation During Infectious and Inflammatory Diseases*. Front Immunol. 2019; 10:3081.

38. Kiszalkiewicz J, Piotrowski WJ, Brzezianska-Lasota E. *Selected molecular events in the pathogenesis of sarcoidosis - recent advances*. *Pneumonol Alergol Pol*. 2015; **83**(6):462-75.
39. 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.
40. Zou KH, O'Malley AJ, Mauri L. *Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models*. *Circulation*. 2007; **115**(5):654-7.
41. Pattnaik B, Sryma PB, Mittal S, Agrawal A, Guleria R, Madan K. *MicroRNAs in pulmonary sarcoidosis: A systematic review*. *Respir Investig*. 2020; **58**(4):232-8.
42. Carleo A, Bennett D, Rottoli P. *Biomarkers in sarcoidosis: the contribution of system biology*. *Curr Opin Pulm Med*. 2016; **22**(5):509-14.
43. Arger NK, O'Connor B, Koth LL. *Molecular profiling in sarcoidosis*. *Curr Opin Pulm Med*. 2020; **26**(5):562-7.
44. Fu Y, Yi Z, Wu X, Li J, Xu F. *Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2011; **49**(12):4246-51.
45. Pacheco Y, Valeyre D, El Jammal T, Vallee M, Chevalier F, Lamartine J, et al. *Autophagy and Mitophagy-Related Pathways at the Crossroads of Genetic Pathways Involved in Familial Sarcoidosis and Host-Pathogen Interactions Induced by Coronaviruses*. *Cells*. 2021; **10**(8).
46. Locke LW, Crouser ED, White P, Julian MW, Caceres EG, Papp AC, et al. *IL-13-regulated Macrophage Polarization during Granuloma Formation in an In Vitro Human Sarcoidosis Model*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019; **60**(1):84-95.
47. Levin AM, Iannuzzi MC, Montgomery CG, Trudeau S, Datta I, Adrianto I, et al. *Admixture fine-mapping in African Americans implicates XAF1 as a possible sarcoidosis risk gene*. *PLoS One*. 2014; **9**(3): e92646.
48. Kavalchuk M, Jomaa A, Muller AU, Weber-Ban E. *Structural basis of prokaryotic ubiquitin-like protein engagement and translocation by the mycobacterial Mpa-proteasome complex*. *Nat Commun*. 2022; **13**(1):276.
49. Zhang P, Wu L, Zhu Y, Liu M, Wang Y, Cao G, et al. *Deletion of MtrA Inhibits Cellular Development of Streptomyces coelicolor and Alters Expression of Developmental Regulatory Genes*. *Front Microbiol*. 2017; **8**:2013.