



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KORONER ARTER HASTALARINDA BYPASS GREFT
CERRAHİSİ ÖNCESİ VE SONRASINDA İSKEMİ/REPERFÜZYON
İLE İLİŞKİLİ MİKORNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Erman KANDİLLİ

DOKTORA TEZİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Muradiye NACAĞ

Gaziantep

2018

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

**TEZİN BAŞLIĞI KORONER ARTER HASTALARINDA BYPASS GREFT
CERRAHİSİ ÖNCESİ VE SONRASINDA İSKEMİ/REPERFÜZYON İLE
İLİŞKİLİ MİKORNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Erman KANDİLLİ

Tez Savunma Tarihi: 14 Aralık 2018

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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

Prof.Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Muradiye NACAK
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Muradiye NACAK

Prof. Dr. Mehtap ÖZKUR

Doç. Dr. Şenay Görücü YILMAZ

Doç. Dr. Hakan KURT

Dr. Öğr. Üy. Murat YARDIMCI

BEYAN

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

14.12.2018

Erman KANDİLLİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, insanlığı, güler yüzü, ve samimiyeti ile çalışmalarına motive olmamı sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Muradiye Nacak'a, çalışmaya katkıları olan Sanko Üniversitesi Kalp ve Damar Cerrahisi Dr. öğretim üyesi Murat Yardımcı'ya, Tıbbi Farmakoloji öğretim üyesi Dr. Necla Benlier'e ve Gaziantep Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Şenay Görücü Yılmaz'a, doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen hocalarım Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Belgin Alaşehirli'ye, Prof. Dr. Tuncay Demiryürek'e ve Sanko Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehtap Özkur'a, İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şükrü Aynacıoğlu'na, bölümde desteklerini ve muhabbetlerini esirgemeyen arkadaşlarıma, yoğun çalışmalarım sırasında sabır gösteren ve bana katlanan Anneme, zorlukları benimle göğüsleyen maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen eşim Büşra'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim. Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından GÜ BAYBP - TF.DT.17.11 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	İ
İÇİNDEKİLER.....	İİ
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİL LİSTESİ.....	X
TABLO LİSTESİ.....	Xİ
ÖZET.....	1
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar.....	5
2.1.1. Epidemiyoloji.....	5
2.2. Koroner Arter Hastalığı.....	6
2.2.1. Tanım.....	6
2.2.2. Koroner arter hastalığı risk faktörleri.....	6
2.3. Koroner Arter Histolojisi.....	7
2.4. Aterosklerotik Plakların Patojenezi.....	8
2.4.1. Lezyon gelişimi.....	9
2.4.2. Aterosklerotik plak gelişimi.....	11
2.5. Aterosklerozun Sınıflandırılması.....	11
2.5.1. İntimal kalınlaşma ve yağlı damarlar.....	11
2.5.2. Patolojik intimal kalınlaşma.....	12
2.5.3. Fibroaterom.....	12
2.5.4. Koroner arter hastalığının klinik bulguları.....	12
2.5.5. Koroner arter hastalığının tedavisi.....	13
2.5.5.1. Farmakolojik Tedavi.....	13

2.5.5.2. Revaskularizasyon.....	14
2.5.6. Koroner arter hastalığının tanısı.....	15
2.5.6.1. Kardiyak belirteçler.....	15
2.6. RNA Yapısı, Tipleri ve Fonksiyonları.....	16
2.6.1. Kodlanan haberci (messenger (mRNA)) RNA.....	17
2.6.2. Kodlanmayan RNA'lar.....	17
2.6.2.1. Housekeeping kodlanmayan RNA'lar.....	17
2.6.2.2. Düzenleyici kodlanmayan RNA'lar.....	18
2.6.3. MikroRNA'lar.....	19
2.6.4. MikroRNA'ların keşfi.....	20
2.6.5. MikroRNA'ların biyogenezi.....	20
2.6.6. MikroRNA'ların fonksiyonları.....	22
2.6.7. MikroRNA'ların isimlendirilmesi ve genomik yerleşimi.....	22
2.6.8. Belirteç olarak miRNA'lar.....	23
2.7. Kardiyovasküler Hastalıklarda MikroRNA'lar.....	24
2.7.1. Kalp yetmezliğinde miRNA'lar.....	25
2.7.2. Kardiyak fibrozisde miRNA'lar.....	27
2.7.3. İskemik kalp hastalığında miRNA'lar.....	27
2.7.3.1. miR-21.....	28
2.7.3.2. miR-320a.....	31
2.7.3.3. miR-181a.....	32
2.7.3.4. miR-199 ailesi.....	33
2.7.3.5. miR-199a.....	33
2.7.3.6. miR-199b.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36

3.1. Gönüllü Seçimi	36
3.2. Plazma Örneklerinin Alınması ve Kodlanması	37
3.3. Gereçler	37
3.3.1. Kullanılan araçlar-gereçler, kimyasal ve sarf malzemeler	37
3.3.1.1. Kullanılan araç-gereçler	37
3.3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri	38
3.4. MikroRNA Analizi	39
3.4.1. Plazma eldesi	39
3.4.2. MikroRNA izolasyonu	39
3.4.3. cDNA reaksiyonunun hazırlanması	41
3.4.4. Primer seçimi	42
3.4.5. Preamplifikasyon reaksiyonunun hazırlanması	43
3.4.6. Dynamic array hazırlanması	45
3.4.6.1. Dynamic array'ın prime edilmesi.....	45
3.4.6.2. Assay plate'in hazırlanması	45
3.4.6.3. Örneklerin hazırlanması	46
3.4.6.4. Dynamic array'e pipetlemelerin yapılması.....	47
3.4.6.5. IFC controller'da dynamic array'in load edilmesi	47
3.4.6.6. Dynamic array'in bioteknoloji'de çalışılması	47
3.5. İstatistiksel Analiz.....	48
3.5.1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time-PCR) gen ifadesinin hesaplanması.....	48
3.5.2. ROC analizi	49
4. BULGULAR	51
4.1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Demografik ve Klinik Bulgular.....	51

4.2. Hasta Grubunun Operasyon Verilerine Ait Bulgular.....	52
4.3. Hasta Grubu ile Kontrol Grubuna Ait Tanısal Değerler	52
4.3.1. Hasta grubundaki miR-21'e ait bulgular	53
4.3.2. Hasta grubundaki miR-181a'ya ait bulgular.....	54
4.3.3. Hasta grubundaki miR-199a'ya ait bulgular.....	55
4.3.4. Hasta grubundaki miR-199b'ye ait bulgular	55
4.3.5. Hasta grubundaki miR-320a'ya ait bulgular.....	56
4.3.6. Hasta ve kontrol grubundaki miRNA'lara ait kat değişim bulguları	57
4.4. Hasta Grubuna Ait Kardiyak Belirteçlere Ait Bulgular	59
4.4.1. Troponin	59
4.4.2. Ejeksiyon fraksiyonu.....	60
4.4.3. Kreatinin fosfokinaz.....	61
4.4.4. Kreatinin kinaz-mb.....	62
4.5. Hasta Grubundaki Tanısal Değerlerin Birbiriyle Olan Korelasyonları.....	62
4.5.1. MikroRNA-21	62
4.5.2. MikroRNA-181a	63
4.5.3. MikroRNA-199a	64
4.5.4. MikroRNA-199b.....	65
4.5.5. MikroRNA-320a	66
4.6. miRNA'ların Duyarlılık ve Özgünlük Analizi (ROC).....	67
4.6.1. MikroRNA-21	67
4.6.2. MikroRNA-181a	68
4.6.3. MikroRNA-199a	68
4.6.4. MikroRNA-199b.....	69
4.6.5. MikroRNA-320a	70

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	71
6. KAYNAKLAR.....	80
7. EKLER.....	100
EK.1. Etik Kurul Kararı	100
ÖZGEÇMİŞ	102



SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

$2^{-\Delta\Delta CT}$	Kat değişim değeri
AMI	Akut miyokard infaktüsü
BUN	Kan üre azotu değeri
CARDIA	Genç Yetişkinlerde Koroner Arter Risk Belirleyicileri
CD36	Farklılaşma kümesi 36
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CK-MB	Kreatinin kinaz-MB
CPK	Kreatinin fosfokinaz
DGCR8	Di George Syndrome Critical Region Gene 8
DM	Diabetes mellitus
DNM	Dynamin
DYRK	Çift özgülükte tirozin fosforilasyon düzenlenmiş kinaz
ECM	Ekstrasellüler matriks
EF	Ejeksiyon fraksiyonu
ESS	Endotelyal kayma gerilimi
FHS	Framingham Kalp Çalışması
GAGs	Glikosaminoglikanlar
Glut-1	Glukoz transpoter-1
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
HO-1	Hemoksijenaz-1
hsa-miR	İnsan mikroRNA
I/R	İskemi reperfüzyonu

ICAM-1	İntraselüler adezyon molekülü-1
K	Kontrol grubu
KKH	koroner kalp hastalığı
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
MCP-1	Monosit kemotaktik protein-1
MHC	Miyozin hafif zincirleri
MiRNA	MikroRNA
MONICA	Kardiyovasküler Hastalıkta Eğilimleri ve Belirleyicileri İzleme
ncRNA	Kodlanmayan RNA
NFAT	Aktifleştirilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü
NOS	Nitrik oksit sentaz
OP1	Operasyondan 1 saat sonra
OP24	Operasyondan 24 saat sonra
PDCD	Programlanmış hücre ölüm proteini
pre-miRNA	Prekürsör miRNA
Pre-op	Operasyon öncesi
pri-miRNA	Primer miRNA
proBNP	pro-beyin natriüretik peptid
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
RISC	RNA kaynaklı susturucu kompleks
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SRF	Serum yanıt faktörü
SRs	Çöpçü reseptörler
STAT	Transkripsiyon aktivatör

TEKHARF	Türk Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri
TM	Tropomiyozin
TMEM49	Transmembran protein 49
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UTR	Translasyona uğramayan bölge
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VMP1	Vakuol membran proteini 1
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Koroner arter tabakaları.....	8
Şekil 2.2. Aterosikleroz gelişiminde rol oynayan proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler.....	10
Şekil 2.3. RNA'ların sınıflandırılması.....	17
Şekil 2.4. MikroRNA yolağı.....	21
Şekil 3.1. ROC Eğrisi	50
Şekil 4.1. Hasta grubundaki miRNA kat değişimleri	58
Şekil 4.2. Hasta grubundaki 1. ve 24. saatlerdeki miRNA kat değişimleri	59
Şekil 4.3. miR-21'e ait ROC değerleri	68
Şekil 4.4. miR-181a'ya ait ROC değerleri.....	68
Şekil 4.5. miR-199a'ya ait ROC değerleri.....	69
Şekil 4.6. miR-199b'ye ait ROC değerleri.....	69
Şekil 4.7. miR-320a'ya ait ROC değerleri.....	70

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Bazı hastalıklardaki miRNA belirteçleri.....	24
Tablo 2.2. Kardiyovasküler hastalıklarda rol oynayan miRNA'lar ve hedefledikleri genler.....	25
Tablo 3.1. cDNA Reaksiyonu için gerekli karışım ve miktarları	41
Tablo 3.2. Thermal cycler'a ait program.....	42
Tablo 3.3. Kullanılan primerler ve katalog numaraları	42
Tablo 3.4. Preamplifikasyon reaksiyonunu oluşturan maddeler ve miktarları.....	44
Tablo 3.5. cDNA reaksiyonunun gerçekleştirilmesine ait program.....	44
Tablo 3.6. Thermal program.....	45
Tablo 3.7. Assay plate'i oluşturan maddeler ve miktarları.....	46
Tablo 3.8. RT-PCR karışımı ve miktarları	46
Tablo 3.9. MikroRNA'ların analiz edilmesinde kullanılacak olan RT-PCR koşulları ..	48
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait demografik ve klinik veriler.....	51
Tablo 4.2. Hasta grubunun operasyonuna ait veriler	52
Tablo 4.3. Operasyon öncesi hasta grubu ve kontrol grubuna ait miRNA Δ Ct değerlerinin karşılaştırılması.....	52
Tablo 4.4. Operasyon öncesi hasta ve kontrol grubuna ait kardiyak belirteç değerleri .	53
Tablo 4.5. Hasta grubundaki miR-21'e ait ortalama Δ CT ve standart sapma değerleri	53
Tablo 4.6. Hasta grubundaki miR-21'e ait değişimlerin karşılaştırılması.....	54
Tablo 4.7. Hasta grubundaki miR-181a'ya ait ortalama Δ CT ve standart sapma değerleri	54
Tablo 4.8. Hasta grubundaki miR-181a'ya ait değişimlerin karşılaştırılması	54
Tablo 4.9. Hasta grubundaki miR-199a'ya ait ortalama Δ CT ve standart sapma değerleri	55
Tablo 4.10. Hasta grubundaki miR-199a'ya ait değişimlerin karşılaştırılması	55
Tablo 4.11. Hasta grubundaki miR-199b'ye ait ortalama Δ CT ve std. sapma değerleri	56

Tablo 4.12. Hasta grubundaki miR-199b'ye ait değişimlerin karşılaştıırılması.....	56
Tablo 4.13. Hasta grubundaki miR-320a'ya ait ortalama ΔCT ve std. sapma değerleri	56
Tablo 4.14. Hasta grubundaki miR-320a'ya ait değişimlerin karşılaştıırılması	57
Tablo 4.15. Hasta grubundaki miRNA değerlerinin kontrol grubuna göre kat değişimleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	57
Tablo 4.16. Operasyon öncesi miRNA değerlerine göre operasyon sonrası miRNA değerlerinin kat değişimleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$).....	58
Tablo 4.17. Hasta grubundaki troponin değerlerinin ortalama ve std. sapma değerleri	59
Tablo 4.18. Hasta grubunda troponin verilerindeki değişimlerin karşılaştıırılması	60
Tablo 4.19. Hasta grubundaki ejeksiyon fraksiyonu değerlerinin ortalama ve std. sapma değerleri.....	60
Tablo 4.20. Hasta grubunda ejeksiyon fraksiyonu verilerindeki değişimlerin karşılaştıırılması.....	60
Tablo 4.21. Hasta grubundaki kreatinin fosfokinaz değerlerinin ortalama ve std. sapma değerleri.....	61
Tablo 4.22. Hasta grubunda kreatinin fosfokinaz verilerindeki değişimlerin karşılaştıırılması.....	61
Tablo 4.23. Hasta grubundaki kreatinin kinaz-MB değerlerinin ortalama ve std. sapma değerleri.....	62
Tablo 4.24. Hasta grubunda kreatinin kinaz-MB verilerindeki değişimlerin karşılaştıırılması.....	62
Tablo 4.25. Hasta grubunda miR-21 ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlar.....	63
Tablo 4.26. Hasta grubunda miR-181a ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlar.....	64
Tablo 4.27. Hasta grubunda miR-199a ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlar.....	65
Tablo 4.28. Hasta grubunda miR-199b ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlar.....	66

Tablo 4.29. Hasta grubunda miR-320a ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlar.....	67
---	----



ÖZET

KORONER ARTER HASTALARINDA BYPASS GREFT ÖNCESİ VE SONRASINDA İSKEMİ/REPERFÜZYON İLE İLİŞKİLİ MİKRORNA DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Erman KANDİLLİ

Doktora Tezi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Muradiye NACAK

Kasım 2018, 102 sayfa

Koroner arter hastalığı, koroner damarların tıkanması ile karakterize kardiyovasküler bir hastalıktır. Koroner damarların tıkanmasına bağlı olarak gelişen iskemik hasar kardiyak remodelling adı verilen hücresel ve moleküler birtakım olayların başlamasına neden olmaktadır. Pekçok organizmada post-transkripsiyonel olarak gen ifadesini düzenleyen mikroRNA(miRNA)'lar bu süreçte önemli role sahiptir. MikroRNA'ların miyokard enfarktüsü ve kalp hasarının önlenmesinde kardiyak belirteç olarak değerlendirilebileceği bildirilmektedir. Bu çalışmada koroner arter hastalarında bypass greft cerrahisi öncesi ve sonrasında iskemi/reperfüzyon ile ilişkili hsa-miR-21-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-320a-5p ve hsa-miR-181a-5p miRNA düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması amaçlandı.

Çalışmaya 46 hasta ve 48 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hastalardan koroner bypass greft öncesinde ve bypass greftten 1 ve 24 saat sonra kan örnekleri alındı. MikroRNA düzeyleri real-time PCR ile saptandı ve delta Ct metoduna göre hesaplandı.

Hasta grubundaki tüm miRNA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Hasta grubundaki miRNA düzeyleri zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde sadece 1. ve 24. saat sonra ölçülen miR-199a-5p düzeyleri arasında anlamlılık bulundu ($p<0.044$).

Sonuç olarak, miR-199a koroner bypass cerrahisi sonrası iskemi/reperfüzyon ile ilişkili olabilir. Ayrıca miR-199b-5p, miR-320a-5p ve miR-181a-5p'nin düşük seviyelerde bulunması, koroner arter hastalığı patogenezinde inflamasyonla ilişkili yolların aktive edilmesinde rolü olabilir. Bu bulguların güçlendirilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Bypass greft cerrahi, İnflamasyon, İskemi/Reperfüzyon, MikroRNA, Koroner arter hastalığı,

ABSTRACT

INVESTIGATING MICRORNA EXPRESSION LEVELS ASSOCIATED WITH ISCHEMIA/REPERFUSION IN CORONARY ARTERY PATIENTS BEFORE AND AFTER CORONARY ARTERY BYPASS GRAFT SURGERY

Erman KANDILLI

PhD Thesis, Department of Medical Pharmacology

Supervisor: Prof.Dr. Muradiye NACAK

November 2018, 102 pages

Coronary artery disease is a cardiovascular disease characterized by obstruction of coronary vessels. Ischemic damage caused by the obstruction of coronary vessels allows the initiation of cellular and molecular events called cardiac remodeling. In many organisms, microRNAs that regulate gene expression post-transcriptionally have an important role in this process. It is reported that microRNAs can be evaluated as cardiac markers in the prevention of myocardial infarction and heart damage. In this study, we aimed to compare levels of microRNAs associated with ischemia / reperfusion (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-320a-5p, hsa-miR-181a-5p) between control group and coronary artery patients undergoing bypass surgery.

46 patients and 48 healthy volunteers were included in this study. Blood samples were taken from these patients before surgery, 1 and 24 hours after surgery. MicroRNA levels in blood samples were detected by RT-PCR and calculated by delta Ct (Δ CT) method. MicroRNA levels were significantly lower in the patients than the control group ($p < 0.001$). When the miRNA levels were evaluated as time-dependent in the patients, there was a significant difference between 1st and 24th only in terms of miR-199a-5p levels that measured after surgery ($p < 0.044$).

In conclusion, miR-199a-5p can be associated with ischemia/reperfusion after coronary bypass surgery. Furthermore low levels of miR-199b-5p, miR-320a-5p and miR-181a-5p may play a role in activating inflammatory pathways involved in the pathogenesis of coronary artery disease. Further studies are needed to support these findings.

Keywords: Bypass greft surgery, Coronary arter disease, Inflammation, Ischemia/Reperfusion, MicroRNA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kalp-damar hastalıkları orta ve ileri yaş grubunda en önemli mortalite nedeni olup küresel ölümlerin %31'ini teşkil etmektedir. Dünya'da her yıl yaklaşık 17.7 milyon kişinin kardiyovasküler hastalıklardan öldüğü bildirilmektedir (1). Amerika'da hem erkek hem de kadınlarda ölüm nedeni olarak ilk sırada yer almaktadır (2). 2030'a kadar kalp hastalığının dünyanın tamamında ölüm nedeni olacağı tahmin edilmektedir (3). 2017 yılının TEKHARF verilerine göre Türkiye'deki ölümlerin %43'ü koroner kalp hastalığından kaynaklanmaktadır. Ülkemizde yaklaşık 3.5 milyon koroner kalp hastası bulunmakta ve bu sayının yılda %4 arttığı, yılda 210 bin kişinin de koroner kalp hastalığından öldüğü tahmin edilmektedir (4).

Koroner kalp hastalığına bağlı gelişen iskemik hasar, kardiyak dokuda kalıcı hasara yol açmakta ve kontraktilitedeki azalma kalp yetmezliğine zemin hazırlamaktadır. Kalp yetmezliğinde hücresel düzeyde miyositlerin hipertrofisi, inflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, kardiyak fibrozis, aritmi, vasküler defektler ve aynı zamanda endotelial hücre canlılığında ve kardiyomiyositlerde azalma gibi etkiler oluşmaktadır. Moleküler düzeyde, etki eden faktörler arasında transkripsiyon faktörleri, ko-aktivatörler ve baskılayıcılar, hızlandırıcı DNA bölgeleri ve promoter unsurları ve kromatin değiştirici enzimler de dahil olmak üzere, çeşitli gen düzenleyici ağlar yer almaktadır (5).

MikroRNA (miRNA)'lar gen ekspresyonunun moleküler şalteri olarak rol oynayan 20-25 nükleotid uzunluğunda kodlanmayan küçük RNA sınıfıdır. Proliferasyon, farklılaşma, hücre metabolizması, apoptozis ve angiogenesis gibi önemli birçok hücresel süreçlerde yer almaktadırlar. Posttranskripsiyonel düzeyde mRNA'dan protein translasyonunu inhibe ederek veya mRNA'nın yıkımını sağlayarak gen ekspresyonunu düzenlemektedirler (5).

MikroRNA'lar diğer hastalıklarda olduğu gibi kardiyovasküler hastalıklarda önemli rol üstlenmektedir. Kalp durmadan çalışan ve vücuda kan pompalayan bir organ olmasından dolayı neonatal dönemden yaşlılığa kadar olan süreçlerde hemoostazı devam ettirebilmek için diğer organlar ile birlikte uyumlu bir şekilde çalışmaktadır. Bu sürecin kontrollü bir şekilde devam ettirilmesinde ve fonksiyonların yerine getirilmesinde miRNA'lar önemli görevler üstlenmektedir. Örneğin kardiyak progenitor hücrelerden salgılanan miR-133 gibi miRNA'lar kalbin yenilenmesinde rol oynarken, miR-1 gibi miRNA'lar pacemaker

aktiviteden sorumlu olmaktadır. Dolayısıyla kardiyovasküler hastalıklarda miRNA'ların düzeyleri değişebilmektedir (6).

Şimdiye kadar vasküler hastalık ile ilişkili miRNA'ları inceleyen çalışmaları incelediğimizde, koroner arter bypass greft hastalarında miRNA'ların değerlendirildiği az sayıda çalışma olduğunu gördük. Bundan dolayı bu tez çalışmasında koroner arter hastalarında yeterince incelenmemiş olan iskemi/reperfüzyonla ilişkili olabilecek miRNA'ları (miR-21, miR-199a, miR-199b, miR181a ve miR320a) seçtik. Bu miRNA'ların düzeylerini koroner arter hastalığı nedeniyle bypass greft cerrahisi olacak hastalarda koroner damarların yeterli oksijeni sağlayamadığı cerrahi tedavi öncesi ve reperfüzyonun sağlandığı cerrahi tedavi sonrası ölçerek, hem sağlıklı kontrol grubu, hem de kendi arasında karşılaştırmayı amaçladık. Diğer bir amacımız da miRNA düzeyleri ile kardiyak belirteçler (kardiyak troponin I ve kreatinin kinaz MB) arasında bir korelasyon olup olmadığını belirlemektir. Bu sayede kalbin reperfüzyonuna bağlı olarak değişebileceğini düşündüğümüz miRNA düzeyleri hakkında somut veriler elde edileceğini düşünmekteyiz. Bu verilerin ileriki yıllarda koroner arter hastalarında biyobelirteç olarak değerlendirileceğini ve koroner arter hastalığının prognozu ile ilgili öngörülerini bize sunacağını umut etmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar

2.1.1. Epidemiyoloji

Dünya çapında, kardiyovasküler hastalıklar her yıl 17.7 milyon insanın hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Bu rakam bütün ölümlerin %31'ini oluşturmaktadır ve %80'i düşük ve orta gelirli ülkelerde gerçekleşmektedir (1). 2030'a kadar kardiyovasküler hastalıklardaki üçte birin üzerinde bir artış ile her yıl 23 milyon insanın yaşamını yitirmesi beklenmektedir (7).

Kardiyovasküler hastalıklar temel olarak koroner kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık, hipertansiyon, periferik arter hastalığı, romatizmal kalp hastalığı, konjenital kalp hastalığı ve kalp yetmezliğini kapsamaktadır (8).

Koroner kalp hastalığı (KKH, iskemik kalp hastalığı), en sık görülen kardiyovasküler hastalıktır. Erkeklerde kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümlerin % 46'sına, kadınlarda ise %38'ine neden olan koroner kalp hastalığı tek başına 1990'dan 2010 yılına kadar yüzde 35 artarak dünya çapında 7 milyon kişinin yaşamını yitirmesine neden olmuştur (9).

Önemli risk faktörlerinin insidansı ve prevalansı büyük ölçüde coğrafi bölge, cinsiyet ve etnik yapıya göre çeşitlilik göstermektedir. Örneğin her 100.000 popülasyonda kardiyovasküler ölüm oranı erkeklerde, Güney Kore'de 35.0 iken, Ukrayna'da 733.0 (20 kat fazla; kadınlarda Fransa'da 11.0 iken Ukrayna'da 313.0 (30 kat fazla) olarak bulunmuştur (10). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nin ölüm verileri toplam ölümlerin içinde kalp hastalıklarının payının gittikçe artma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Kalp hastalıkları 1989'da %40, 1993'te %45, 2009'da %40 ve 2013'te %39.6, 2014 yılında %40.4 ile tüm ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almıştır. Kardiyovasküler sistem hastalıkları nedeniyle gerçekleşen ölümlerin %39.6'sı iskemik kalp hastalığı, %24.7'si serebrovasküler hastalık, %18.8'i diğer kalp hastalığı ve %11.6'sı hipertansif hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Ayrıca ölüm nedenleri yaş grupları itibarıyla incelendiğinde kardiyovasküler sistem hastalıklarının en fazla 75-84 yaş grubunda görüldüğü, ölüm nedenleri daimi ikametgaha göre incelendiğinde ise kardiyovasküler sistem hastalıkları kaynaklı ölümlerin oranının en yüksek olduğu ilk beş ilin sırasıyla Denizli, Kırklareli, Yozgat, Samsun ve Artvin olduğu da tespit edilmiştir (11).

2.2. Koroner Arter Hastalığı

2.2.1. Tanım

Koroner arter hastalığı, kalp kasını (miyokard) besleyen koroner arterlerin daralma veya tıkanması ile kan akımının kısmi yada tam kesilmesine bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Lipid dolu plakların damarları tıkanmasına neden olan ateroskleroz sonucu gelişmektedir (12). Aterosklerozun başlamasına ve ilerlemesine neden olan faktörlerin en önemlisi dislipidemi olmasına rağmen inflamasyonda önemli katkıları olduğu son 10 yıl da önem kazanmıştır. Aterosklerozu olan hastalarda, bir inflamasyon belirteci olan C-reaktif protein değerlerinin de yüksek olduğu bulunmuştur. Kronik enfeksiyon, obezite ve yağlı diyetin inflamasyona neden olduğu ve inflamasyona yol açan faktörlerin de aterosklerozun gelişmesine katkıda bulunduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (13).

2.2.2. Koroner arter hastalığı risk faktörleri

Koroner arter hastalığının risk faktörleri değiştirilebilen, değiştirilemeyen ve diğerleri (yeni tanımlanan) olmak üzere 3 sınıfa ayrılmıştır:

- I. Değiştirilebilen risk faktörleri:
 - a. Yaşam tarzının kontrolüyle değiştirilebilen risk faktörleri: Sigara içiciliği, obezite ve fiziksel inaktivite.
 - b. Medikal tedavi ve diyet yardımıyla düzeltilebilecek risk faktörleri: Hipertansiyon (kan basıncı $\geq 140/90$ mmHg veya antihipertansif tedavi görüyor olmak), lipid metabolizma bozuklukları (total kolesterol ≥ 200 mg/dl, LDL-kolesterol ≥ 130 mg/dl, HDL-kolesterol < 40 mg/dl), diabetes mellitus ve insülin rezistansı.
- II. Değiştirilemeyen risk faktörleri:
 - a. Yaş (erkeklerde ≥ 45 , kadınlarda ≥ 55 veya erken menopoz),
 - b. Erkek cinsiyeti,
 - c. Aile hikayesi (birinci derece akrabalarından erkekte 55, kadında 65 yaşından önce koroner arter hastalığı bulunması)
- III. Diğer (yeni tanımlanan) risk faktörleri: homosistein yükseliği (14), trombotik risk faktörleri, lipoprotein (a) yüksekliği (15) ve inflamatuvar faktörlerdir (16, 17).

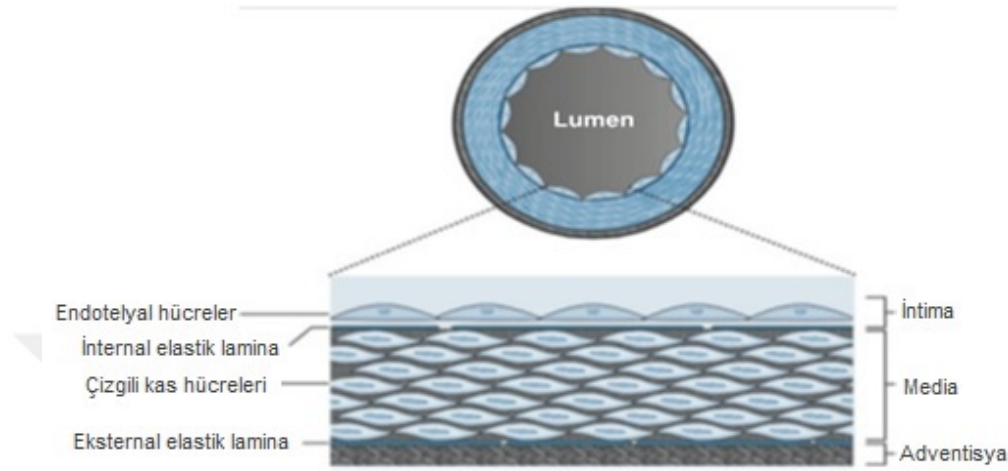
Vücutta bu risk faktörlerine yanıt olarak bir taraftan sistemik akut faz reaktanları aktive olurken, diğer taraftan endotel hasarına bağlı olarak adezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve sitokinler salınmaya başlamaktadır (18). Sonuçta enflamasyon, trombosit birikimi ve koroner arterlerde vazokonstriksiyon meydana gelmekte ve ateroskleroz süreci başlamaktadır (19, 20). Bundan dolayı koroner arter hastalığından korunma stratejilerinin temelinde, hastalığa yol açan yaşam tarzının ve çevresel faktörlerin değiştirilmesi ve yüksek riskli bireylerin belirlenerek bu bireylerde özel önlemler alınması bulunmaktadır (17).

Epidemiyolojik çalışmalar, koroner kalp hastalığının gelişiminde ve prognozunda rol alan risk faktörleri hakkında çok değerli bilgiler sağlamaktadır. Aynı zamanda bu risk faktörlerine yönelik primordial, primer ve sekonder önleme yöntemlerini ortaya koymayı amaçlamaktadır. Primordial önleme, KKH'nın hipertansiyon, obezite, dislipidemi gibi risk faktörlerini önlemeyi amaçlamaktadır. Primer önleme yaşam tarzının değiştirilmesi, sigara gibi risk faktörlerinin azaltılması ve/veya düzeltilmesine odaklanmakta ve KKH'nın klinik bulgularını önlemeyi amaçlamaktadır. Sekonder önleme aterosklerotik sürecin sonuçlarına ait hastalıklar ortaya çıktıktan sonra yeni olayların tekrarının veya hastalığın ilerlenmesinin önlenmesine yönelik girişimlere odaklanmaktadır (21).

2.3. Koroner Arter Histolojisi

Arterler endotelial hücreler, vasküler düz kas hücreler ve ekstraselüler matriks adı verilen üç ana bileşenden oluşmaktadır. Ekstraselüler matriks, kollajen, elastin ve glikosaminoglikanlardan (GAGs) oluşmaktadır. Bu komponentler iç içe geçmiş halkalar ile biçimlenerek üç belirgin tabaka ile sıralanmaktadır. Damar lümenine bağlı olan tabaka tunica intima'dır ve bazal membran üzerindeki tek endotelial hücrelerden oluşmaktadır. Endotel hücreleri tip IV kollajen, laminin ve fibronektin sentezlemektedir. Bazal membranın hemen altındaki tabaka internal elastik lamina olarak adlandırılan ekstraselüler matriks tabakasıdır. Bu tabaka tunica media'nın en iç kısmını oluşturmaktadır. Tunica media vasküler düz kas hücreleri ve elastik fiber katmanların bileşiminden oluşmuştur. Damar duvarının dış tabakasını tunica adventisya oluşturur ve tunica media'nın etrafını sarmaktadır. Tunica adventisya küçük kan damarları ve sinir fiberlerini içeren vaso vasorum olarak adlandırılan bağlayıcı doku bileşenlerinden oluşmaktadır. İntima ve media'nın iç kısmı difüzyon prosesi ile luminal kandan besinleri alırken, vaso vasorum adventita ve media'nın dış kısmına oksijen ve besin desteği sağlamaktadır. Koroner arterlerin adventisyalı daha kalındır. Kalbin sistol ve

diyastol'lerine bağı olarak tekrar tekrar kıvrıldıkları için bu damarların adventisya ve media'larında dairesel kollagen lif demetleri ve longitudinal düz kas demetleri bulunur. Kollagen lif/elastik lif oranının yüksek oluşuna bağı yüksek gerilme gücü sayesinde nispeten daha az gerilebilmektedirler (22).



Şekil 2.1. Koroner arter tabakaları (22)

2.4. Aterosklerotik Plakların Patojenezi

Ateroskleroz koroner arter hastalığı, karotid arter hastalığı ve periferik arter hastalığının en önemli nedenlerinden birisidir. Ateroskleroz tek başına ölümcül değildir; rüptüre olmuş veya aşınmış aterosklerotik plağa trombozun eklenmesiyle akut koroner sendrom ve inme gibi yaşamı tehdit eden klinik olayların gerçekleşmesine zemin hazırlamaktadır (23-25). Bundan dolayı aterosklerozun gelişiminden ziyade tromboza meyilli plakların oluşumunu engellemek daha önem arz etmektedir (26).

Birçok kardiyovasküler risk faktörleri arasında plazma kolesterol düzeyinin yüksek olması aterosklerozun gelişmesi için tek başına bile yeterli olmaktadır. Yetişkinlerdeki plazma kolesterol düzeyinin 150 mg/dL'den düşükse hastalığın semptomlarının görülmesi nadirdir. Aterojenik düşük dansiteli lipoprotein (LDL) düzeylerinin artmasına neden olan risk faktörleri arasında hipertansiyon, diyabet, sigara kullanımı, yaş, cinsiyet, C reaktif proteini, sitokinler gibi inflamatuvar belirteçler bulunmaktadır. Bu risk faktörleri hem LDL'nin aterojenisitesini (partikül çapı, sayı ve bileşimi) hem de arteriyal duvarın duyarlılığını (permeabilite, glikasyon ve inflamasyon) arttırmaktadır (27).

Aterosklerozun gelişmesinde yukarıda belirtilen sistemik risk faktörleri yanında endotel kayma gerilimi (endothelial shear stress, ESS) de rol oynamaktadır (25). Endotel kayma gerilimi kanın arter duvarının endotel yüzeyi üzerinde akımı sırasındaki sürtünme sırasında oluşan yüzeysel basınç kuvvetidir. Laminar kan akışının bozulmuş olduğu damar bölgelerinde (örn, koroner arterde) düşük endotel kayma gerilimi oluşmakta ve buna bağlı aterosklerotik lezyon oluşumu hızlanmaktadır (28).

Egzersiz ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ve onun major lipoproteini olan apoA-1, ateroskleroz ve trombozisle ilişkili hastalıklara karşı koruyuculuk sağlamaktadır. HDL/apo-I, LDL'nin aterojenik modifikasyonunu önlemektedir (29).

2.4.1. Lezyon gelişimi

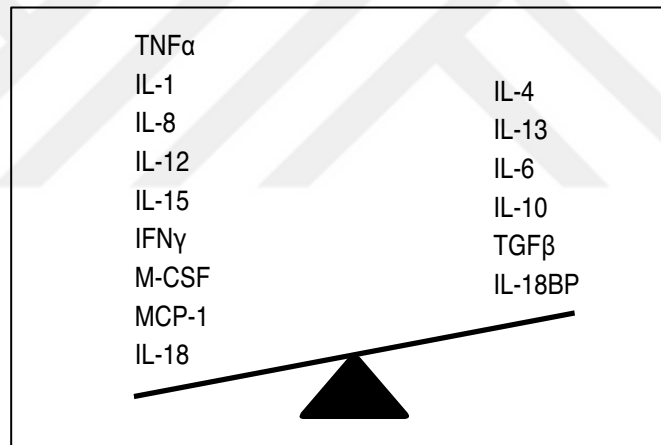
Ateroskleroz temel olarak geniş ve orta büyüklükteki arterleri tutan kronik, inflamatuvar, fibroproliferatif bir hastalıktır (27, 30). Ateroskleroz gelişiminde endotel hücreleri, lökositler ve intimal düz kas hücreleri önemli rol oynamaktadır (14). Yapısı bozulmuş endotel hücrelerinin subendotelyal boşluğuna plazma proteinleri ve lipoprotein partikülleri sızmaktadır. Burada potansiyel aterojenik lipoproteinler kalarak modifiye, sitotoksik, proinflamatuvar, kemotaktik ve proaterojenik hale gelmektedir. LDL, okside hale geldiği ve ESS'nin bozulduğu durumlarda aterojenik hale gelmektedir (28, 31). Oksidasyon mekanizmasına miyeloperoksidaz, 15-lipooksijenaz ve nitrik oksit sentaz (NOS) aracılık etmektedir. Nitrik oksit, endotel hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen, üretim kaynağına bağlı hem aterojenik hem de protektif etkilere sahip potent oksidan bir moleküldür. Endotelyal NOS tarafından üretilen nitrik oksit potansiyel olarak ateroprotektiftir. Oysa makrofajlarda yüksek derecede üretilen indüklenebilir NOS'un ürettiği nitrik oksit potent oksidatif özelliklere sahiptir ve potansiyel olarak proaterojeniktir (32).

Aterojenik ve proinflamatuvar uyarı ile endotelin aktif hale gelmesi sonucunda primer vasküler hücre adezyon molekülü-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) aktif hale geçerek, monosit ve T lenfositler göç etmeye başlamaktadır. Aterosklerotik lezyonun gelişmesine intraselüler adezyon molekülü-1 (intracellular adhesion molecule, ICAM-1), E-selektin ve P-selektin gibi adezyon molekülleri katkıda bulunmaktadır (33).

Nitrik oksit aracılı vazodilatasyonun bozulmuş olmasının sonucu olarak gerçekleşen endotelyal disfoksiyon, ateroprotektif mekanizmanın ortadan kalkmasına ve aterotrombozun ilerlemesine yol açmaktadır. Bu nedenlerden dolayı endotel tabakasının

antiinflamatuvar ve antitrombotik özellikleri, vazodilatör özelliğinden daha önemli hale gelmektedir (34).

Endotel hücrelerde lezyonun gerçekleşebilmesi sadece adezyon moleküllerinin varlığı yeterli olmayıp, kemotaktik sitokinlerin varlığı da gereklidir. Bu süreç interlökin-1, interlökin-6, tümör nekroz faktör- α ve monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretilmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa-B'nin (NF- κ B) aktif hale gelmesiyle başlamaktadır (36). Deneysel çalışmalar okside LDL ve MCP-1'in önemli kemoatraktanlar olduğunu göstermektedir. MCP-1 en güçlü kemokindir ve monosit/makrofajlarda bağlandığı reseptörler plak gelişimi esnasında aşırı derecede upregüle olmaktadır. MCP-1 potansiyel olarak hem monosit hem de T hücrelerini kendine çekmektedir ve bu hücrelerin göçünde temel rol oynamaktadır. Endotelial hücreler, düz kas hücreleri ve makrofajlar aterosklerozda MCP-1'in aşırı eksprese olmasına katkı sağlamaktadır (27).



Şekil 2.2. Ateroskleroz gelişiminde rol oynayan proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler (18)

İntima içerisinde biriken monositler makrofajlara farklılaşmakta ve çöpçü reseptörler (scavenger receptors, SRs) sayesinde aterojenik lipoproteinlere internalize olmaktadır. Köpük hücreleri olarak adlandırılan kolesterol esterlerini çok miktarda içeren lipid yüklü makrofajlar, hem erken ve hem de geç aterosklerotik lezyonların ayırıcı özelliğidir. Makrofajlar aterosklerotik lipoproteinleri ölene kadar yerler. Apoptoz ve nekroz ile makrofajların ölümü, plak içerisinde stabilize olmayan lipitten zengin bir çekirdek oluşumuna neden olmaktadır (37).

Aterosklerozun gelişimi için lenfositlere ihtiyaç olmamasına rağmen immun sistem aterosklerozun ilerlemesini modüle etmektedir. İmmün sistemin aktivasyonundan sorumlu modifiye LDL, ısı-şok proteinleri, beta-2-glikoprotein I ve mikrobiyal antijenler gibi aday antijenler bulunmaktadır. Bunlar içerisinde okside LDL'nin önemli olduğunu ve aterosklerotik plaklar içerisinde yoğun bir şekilde bulunduğunu gösteren veriler bulunmaktadır (38, 39). Aterosklerozun ilerlemesiyle intimal düz kas hücreleri tarafından gelişen fibroproliferatif yanıt immunoinflamatuar yanıtı katılmaktadır. İntimal düz kas hücreleri arteriyal yaralanmadan sonra tamir ve iyileşmeden sorumlu olmaktadır. Aterojenik uyarı yıllarca devam ederse bu hücrelerin yapmış oldukları düzeltici yanıt fazla olmakta, lümendeki hakimiyet kaybolarak kan akışı azalmakta ve iskemi başlamaktadır (39).

2.4.2. Aterosklerotik plak gelişimi

Akut koroner sendromunun birçoğu trombozdan kaynaklanmaktadır. Trombozun ruptür, erozyon ve kalsifiye nodül olmak üzere üç ayırıcı morfolojisi bulunmaktadır. Trombozdan kaynaklanan ani koroner ölümün altındaki mekanizma en sık ruptür (% 55-56) takiben erozyon (% 30-35) ve en az sıklıkla kalsifiye nodüllerdendir (% 2-7). Plak ruptürleri, bir lezyon içerisinde büyük nekrotik çekirdek ve bu çekirdeğin üzerinde ince fibröz başlık ile gelişmekte ve bu bölgeye yüksek miktarda makrofaj ve T-lenfositler sızmaktadır. Erozyonlar luminal tromboz ile karakterizedir ve çok az inflammatuar hücre içermektedir. Kalsifiye nodül, koroner trombusun en az görülen nedenidir ve lümene penetre olmuş kalsifiye tabaka içermektedir (40).

2.5. Aterosklerozun Sınıflandırılması

2.5.1. İntimal kalınlaşma ve yağlı damarlar

En erken vasküler değişiklik mikroskobik olarak tanımlanan ekstraselüler matriks ve düz kas hücre tabakalarındaki intimal kalınlaşmadır (Tip 1 lezyon). İntimal kalınlaşma, ateroskleroza eğilimli koroner, carotid, abdominal ve aort damarlarının inen kısmı ve iliak arterlerde daha sıklıkla görülmektedir. Düz kas hücrelerinin yaşam boyunca çok az proliferatif aktivite gösterdiği bilindiğinden beri bu değişikliğin adaptif olduğu aterosklerotik olmadığı düşünülmektedir (41).

İntimal ksantoma veya yağlı damar olarak adlandırılan Tip 2 lezyon, primer olarak proteoglikan bakımından zengin intima ve düz kas hücreleri içerisinde dağılmış yoğun köpük hücreleri bileşiminden meydana gelmektedir. Bu lezyon, Amerikan Kalp Derneği

sınıflandırmasına göre aterosklerozun en erken lezyonudur. Yapılan hayvan ve insan çalışmalarında tersine çevrilebilir bir süreç olduğu gösterilmiştir (42).

2.5.2. Patolojik intimal kalınlaşma

Patolojik intimal kalınlaşma (Tip 3 lezyon) progresif lezyonların en erken dönemidir. Hücre içermeyen bu lezyon, proteoglikan ve hiyaluronik asit açısından zengin, lipit havuzunun altında ve proteoglikan kollajen matriks içerisindeki damar düz kas hücreleri tabakasından oluşmaktadır. Lipit havuzundaki ekstraselüler matriksin proteoglikanları düşük dansiteli lipoproteinlerin bağlanması ve agregasyonu açısından bir yüzey oluşturmaktadır. Bununla birlikte proteoglikanlardaki glikozamin zincirlerinde gerçekleşen yapısal değişiklikler aterojenik lipoproteinlerin tutulmasını ve bağlanmasını kolaylaştıran proaterojenik basamağı oluşturmaktadır (43, 44). Plâkın luminal yüzeyine çeşitli makrofajların birikmesi patolojik intimal kalınlaşmanın önemli bir başka özelliğidir ve bütün lezyonlarda görülmemektedir. Makrofajların biriktiği patolojik intimal kalınlaşma plak gelişiminin en ileri aşamasını oluşturmaktadır (43).

2.5.3. Fibroaterom

Fibroaterom (tip 4 lezyon), matriksten yoksun hücresel birikintilerden oluşan nekrotik bir çekirdekten meydana gelmektedir. Nekrotik çekirdek proteoglikan-kollajen matriks içerisindeki düz kas hücrelerini içeren kalın fibroz bir başlık ile çevrilidir. Fibroz başlık lezyonun bütünlüğü için kritik rol oynamaktadır (40).

2.5.4. Koroner arter hastalığının klinik bulguları

Koroner arter hastalığı çeşitli şekillerde ortaya çıkabilmektedir. Klasik bulgu miyokardiyal iskemiye bağlı göğüs ağrısıdır (anjina pectoris). Anjina pectorisin temel nedeni kalbin oksijen gereksinimi ile koroner damarlar ile kalbe sağlanan oksijen arasındaki dengesizliktir. Efor anjinasında, özellikle egzersiz sırasında, miyokardiyal oksijen gereksinimi arttığında, koroner kan akımı aynı oranda artmamakta ve dengesizlik oluşmakta, böylelikle iskemi ve ağrıya neden olmaktadır. Bazı kişilerde iskemiye her zaman ağrı eşlik etmemekte ve bu durum “sessiz” veya ambulator iskemi olarak adlandırılmaktadır. Varyant anjinada ise reversibl koroner vazospazm sonucu oksijen sunumu azalmaktadır. Anjina epizodları dinlenme halindeyken geliştiğinde, önceden stabil anjinası olan hastalarda göğüs ağrısının şiddeti, sıklığı ve süresinde artış olduğunda, bir akut koroner sendrom olan, stabil olmayan anjina, ST elevasyonlu veya ST elevasyonsuz miyokard infarktüsü gelişmektedir. Stabil olmayan anjina; artmış koroner

arter direnci veya aterosklerotik plak çevresinde oluşan küçük trombosit pıhtıları nedeniyle oluşmaktadır (45).

2.5.5. Koroner arter hastalığının tedavisi

Miyokard iskemisi, miyokard oksijen sunumu ve ihtiyacı arasındaki dengesizlik neticesinde oluştuğundan, genel olarak tedavinin hedefi sunumu arttırmak ve/veya ihtiyacı azaltmaktır. Kalp hızı miyokard oksijen ihtiyacının ana belirleyicisidir ve kontrol altına alınması büyük önem taşır. Kalp hızını arttıran herhangi bir tedavi miyokard iskemisini önlemede genellikle yetersiz kalır. Bu nedenle, kan basıncını düşüren ve refleks taşikardiye sebep olabilen hidralazin gibi güçlü vazodilatör tedavileri kullanırken dikkat edilmelidir. Ayrıca, koroner kan akımının çoğu diyastolde gerçekleştiğinden, diyastol süresi ne kadar uzunsa koroner kan akımı o kadar fazla olur; ve kalp hızı ne kadar yüksekse, diyastol süresi o kadar kısalır. Diğer taraftan koroner aterosklerozlu bir hasta için uzun vadedeki hedef hastalık gelişimine sebep olan risk faktörlerinin azaltılmasıdır. Hastalara egzersiz yapmaları, kilo vermeleri, sigarayı bırakmaları ve stressle mücadele etmeleri konusunda tavsiyelerde bulunulur. Eğer risk faktörleri ile düzelme sağlanamazsa, farmakolojik tedavilere geçilmektedir (47).

2.5.5.1. Farmakolojik Tedavi

Koroner arter hastalarının hepsinde kontrendikasyon olmadıkça rutin olarak 75-162 mg/gün aspirin kullanması önerilmektedir. Aspirine alerjisi veya intoleransı olan ve aspirin kullanamayan hastalara 75 mg/gün klopidoğrel verilebilmektedir. Klopidoğrel ve aspirin kombinasyonunun kullanımı yüksek riskli kararlı koroner arter hastalarında önerilmektedir (48).

Nitratlar, anjina pektoris tedavisinde kullanılan en eski ilaçlardır. Esas olarak vasküler endotel ve arteryel düz kasa daha fazla nitrik oksit sağlayıp vazodilatasyona yol açarak etki ederler. Nitratlar venodilatasyon da yaparlar, bu da kalbin ön yükünü azaltıp sol ventrikül diyastol sonu hacmini düşürür. Düşmüş sol ventrikül hacmi duvar gerilimini ve miyokard oksijen ihtiyacını azaltır. Akut atak tedavisinde ve anjina gelişiminin önlenmesinde kullanılırlar. Bu ilaçlar hastalığın karakteristiğine uyacak şekilde birden fazla formülasyonda bulunmaktadır. Koroner ateroskleroz olduğu bilinen hemen her hasta akut anjina pektoris ataklarını dindirmek için hızlı etkili nitrogliserin taşınmalıdır (49).

β -adrenerjik reseptör blokerleri, kalbin β_1 reseptörlerini bloke ederek kalp üzerindeki sempatoadrenal tonusu azaltırlar. Böylece kalbin kontraktilitesini, hızını ve debisini azaltarak kalbin oksijen ihtiyacını azaltırlar. Kalbin atım sayısını düşürdüklerinden myokardın perfüzyonu da artar. Özellikle stabil anjinalın kronik profilaksi tedavisinde kullanılırlar (49).

Kalsiyum kanal antagonistleri, koroner damar düz kası ve myokard hücre membranında voltaja-bağımlı kalsiyum kanallarını bloke ederek depolarizasyon sırasında hücre içine kalsiyum girişini engellerler. Damarların, özellikle arteriyollerin düz kaslarını gevşeterek güçlü vazodilatör etki yaparlar. Koroner arterlerin dilate olması miyokardiyal kan akımını artırır, böylece myokard oksijen tüketimi azalmış olur (49).

Ranolazin, iskemik miyokard hücresindeki geç sodyum kanallarını selektif olarak inhibe ederek etki gösteren yeni bir antianjinal ajandır. Böylelikle sitozol içine sodyum bağımlı kalsiyum girişinde ve intraselüler kalsiyum düzeylerinde azalmaya ve diyastolik sertlikte azalmaya ve diyastolik kan akımında iyileşmeye neden olur. Kalp hızı, kontraktilite ve kan basıncı üzerinde olumsuz etkisi yoktur. Kronik anjinalı hastaların tedavisinde, tek başına veya diğer antianjinal ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır (49).

İvabradin, izole olarak kalp atım hızını azaltan antianjinal bir ilaçtır. S-A düğümde spontan diyastolik depolarizasyonu kontrol eden ve kalp atım hızını düzenleyen If akımının (içe yönelik sodyum akımı) selektif ve spesifik inhibisyonu yoluyla etkisini gösterir. Kardiyak etki sinüs düğümüne özeldir. Böylece kalp atış hızı ve dolayısıyla kalbin işi ve oksijen tüketimi azalır. Anjinalılarda egzersize toleransı artırır. Normal sinüs ritmi olan ve β bloker ve/veya kalsiyum kanal antagonist intoleransı veya kontrendikasyonu olan hastalarda kronik stabil anjina pektorisin semptomatik tedavisinde endikedir (48).

2.5.5.2. Revaskülarizasyon

Revaskülarizasyon tedavisi kateter temelli metodlar ve koroner arter bypass greftleme cerrahisini kapsamaktadır. Kateter temelli metodlar, standart perkütan koroner girişim (PKG), balon dilatasyonu ve metal stent yerleştirilmesidir. Perkütan koroner girişim bir ya da iki damarında, bir ya da daha fazla darlığı (lezyon) olan semptomatik hastalar için idealdir. Daha fazla kompleks lezyonları olanlar veya 3 ya da daha fazla damarında hastalığı olanlarda çeşitli nedenlerden dolayı bypass cerrahisi öncelik kazanmaktadır. Örneğin; PKG ile restenoz riski her lezyon için aynı olduğundan birkaç damara PKG

yapılırsa restenoz riski %100'e yaklaşacak olması, %50 ve üzerinde sol ana koroner darlığı ve/veya 3 damar hastalığı olan hastalarda iskemik kökenli olduğu düşünülen yaşam tehdit edici aritmi olması gibi...

Yapılan kontrollü klinik çalışmalar, koroner bypass greftleme cerrahisinin hastaların %80'inde anjina semptomlarını başarılı bir şekilde giderdiğini göstermiştir (50).

2.5.6. Koroner arter hastalığının tanısı

Koroner arter hastalığında tanıya giden ilk yol gerek hekimin gerekse hastanın hastalıktan şüphe etmesidir. Öncelikli olarak hastanın tıbbi hikayesi, semptomları ve sahip olduğu risk faktörleri değerlendirilmektedir. Bu değerlendirmelerden sonra koroner arter hastalığının varlığı ve biçimi ile ilgili elektrokardiyogram (EKG) testleri, kan testleri ve invazif testler uygulanmaktadır. Başlıca kullanılan testler; efor testi, miyokard perfüzyon sintigrafisi, stres ekokardiyografi ve koroner anjiyografidir. Mevcut tanı yöntemlerinin en etkilisi koroner anjiyografidir. Biyokimyasal testler değerlendirilirken eğer hastada koroner arter hastalığına bağlı varyant angina söz konusu ise kardiyak troponin gibi "kardiyak belirteçler" mutlaka bakılmalıdır (51).

2.5.6.1. Kardiyak belirteçler

Kalp kası hücrelerine oksijen temin edilememesi halinde bir dizi olaylar sonucu hücre içindeki iyonlar, metabolitler ve proteinler gibi daha büyük yapıli moleküller dolaşıma geçmektedir. Protein yapısındaki bazı moleküllerin dolaşımdaki düzeyleri analiz edilerek hastaya enfarktüs ekarte tanısı konulmaya, enfarktüs ekarte edilmeye veya hastalığın prognozu ile ilgili olarak bilgi edinilmeye çalışılmaktadır. İyonların ve düşük moleköl ağırlıklı metabolitlerin hücreler arası sıvıya oradan da dolaşıma geçişi hızlı olmaktadır. Ancak bunlar myosite spesifik olmadıkları için nekroz belirteci olarak kabul edilmemektedir. Diğer taraftan, küçük moleköl ağırlıklı proteinler dönüşümlü hücre hasarı kademesinde dolaşıma geçmektedirler. Protein ve enzim gibi makromoleküller belli ölçüde kalbe spesifik olmalarına rağmen dönüşümsüz bir hücre hasarı olduktan sonra dolaşımda görölmektedirler. Bunların kardiyak belirteç olabilme özellikleri hipoksiden hemen sonra yükselmeye başlamalarına, dolaşımda belli süre kalmalarına ve kalp kası hücrelerine spesifik olmalarına bağıli olmaktadır (52).

Kalp krizi sırasında normalde kalp kası hücrelerinin içinde bulunan proteinler hasar görmüş myositte çıkararak kan dolaşımına geçmektedir. Dolaşımda bu proteinlerin düzeyleri analiz edilerek hastaya enfarktüs tanısı konulmaya çalışılmaktadır. Bu sebeple "troponin

I, troponin T, kreatinin kinaz ve izoformları (CK-MB), laktat dehidrojenaz (LDH) myoglobin, yağ asidi bağlayıcı protein (FABP)” gibi çeşitli proteinler kardiyak belirteç olarak tanımlanmıştır (52).

Kardiyak markerlar dolaşımında bulunma süreleri farklı olmaktadır:

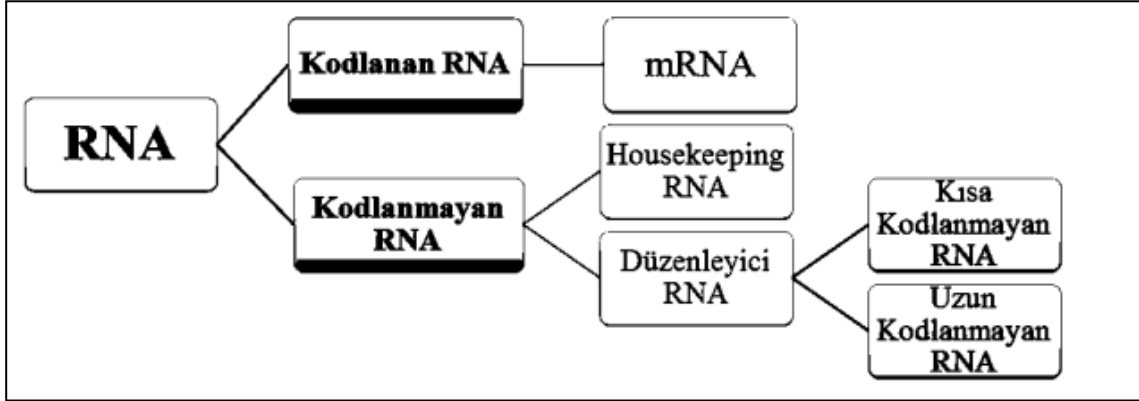
- I. AMI’da plazmada erken dönemde yükselip erken düşenler: CK-MB, CK-MB izoformları, Total CK.
- II. AMI’da plazmada erken dönemde yükselip geç düşenler: TnI, TnT, AST, Total CK
- III. AMI’da plazmada geç dönemde yükselip geç düşenler: Total CK, AST, Total LDH,

Total CK, AST, LDH ve LDH-1 testlerinin tanı değeri düşük kabul edilerek son zamanlarda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından seçilmiş kardiyak belirteç grubu olarak CK-MB izoformları, CK-MB, TnI ve TnT rapor edilmektedir. Troponin I’nın kardiyak spesifikliğı ve uzun serum yarılanma ömrü nedeni ile gittikçe birinci dereceden tercih edilen bir belirteç olduğı, troponin T’nin daha düşük bir kardiyak spesifikliğıne rağmen ikinci derecede bir belirteç olabileceğı, CK-MB’nin ise troponinlere rağmen önemli kardiyak belirteç olmaya devam ettiğı görölmektedir. Kardiyak troponinlerle karşılaştırıldıklarında CK-MB düşük kardiyak spesifiklik ve enfarktüs sonrası serumda uzun süre kalmama gibi dezavantajları vardır. Yağ asidi bağlayıcı protein (FABP) üzerinde çalışmalar sürmektedir ve iyi bir belirteç olabileceğı sanılmaktadır. Bütün bunlara rağmen sonuç olarak henüz ideal bir belirteç ne yazık ki tanımlanamamıştır (52).

2.6. RNA Yapısı, Tipleri ve Fonksiyonları

RNA’lar, DNA’nın nükleotit dizi bilgisini nükleustan sitoplazmaya taşıyan ve bu genetik şifreye göre protein sentezini gerçekleştiren biyomoleküllerdir, diğeri bir deyişle genin ifade edilmesini sağlarlar (53, 54). Temel yapısında tek iplikli bir şeker fosfat iskeleti ve iskelet üzerinde yerleşmiş olan Adenin, Guanin, Sitozin ve Urasil bazları bulunmaktadır (53, 55). Ökaryotik DNA’ların %90’nı RNA’ya transkribe olmaktadır. Transkribe olan RNA’nın ise sadece %2-3 kadarı proteine çevrilmektedir. Proteine çevrilemeyen RNA’lara kodlanmamış RNA (non-coding RNA, ncRNA) adı verilmektedir. ncRNA’ların birçok biyolojik süreçlerde önemli görevleri bulunmakta (56) ve yaşam için gerekli (housekeeping) ncRNA’lar ve düzenleyici ncRNA’lar olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadırlar. Housekeeping RNA’lar canlıların bütün dokularında bulunarak çok

sayıda işlevleri yerine getirirken, gen ifadesinin düzenlenmesinde işlevleri olan düzenleyici ncRNA'lar ise nükleotit (nt) sayılarına göre uzun ncRNA (>200nt) ve kısa ncRNA(<200nt) olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (57, 58).



Şekil 2.3. RNA'ların sınıflandırılması (57, 58)

2.6.1. Kodlanan haberci (messenger (mRNA)) RNA

DNA'daki genetik bilginin proteine çevrilmesinde aracılık eden RNA'dır. DNA üzerindeki genetik bilginin, mRNA molekülüne aktarılmasına transkripsiyon (yazılma), mRNA'dan protein molekülü şekline dönüştürülmesine translasyon (çeviri) adı verilmektedir (59).

2.6.2. Kodlanmayan RNA'lar

Housekeeping ve düzenleyici kodlanmayan RNA'lar olarak iki gruba ayrılırlar:

2.6.2.1. Housekeeping kodlanmayan RNA'lar

Canlının tüm dokularında bulunup çeşitli işlevleri vardır. Bu sınıfa ait kodlanmayan RNA'lar ve fonksiyonları aşağıda özetlenmiştir (57, 60) :

rRNA (ribozomal RNA): Ribozomun oluşumunu sağlar ve mRNA'ların ribozoma bağlanmasında ve translasyonda önemli rol oynar.

tRNA (taşıyıcı RNA, transfer RNA): Translasyon sırasında aktifleşmiş aminoasitleri mRNA' daki kodon dizisine uygun olarak ribozom-mRNA kompleksine taşır.

snRNA (küçük nüklear RNA, small nuclear RNA): Yeni sentezlenen pre-mRNA' ların işlenmesi sırasında kesip-ekleme işlemlerini yapar

snoRNA (küçük nükleolar RNA, small nucleolar RNA): Çekirdekçikte rRNA'nın işlenmesinde görev alır.

sgRNA (rehber RNA, single guide RNA): RNA'nın işlevlerini yerine getirmesi için RNA'nın doğru hedefe yönlendirilmesinde görev alır.

2.6.2.2. Düzenleyici kodlanmayan RNA'lar

Düzenleyici ncRNA'ların fonksiyonu RNA'ların ve proteinlerin işlevsel modifikasyonunu gerçekleştirmektir. Boyutlarına göre uzun ve kısa kodlanmayan RNA'lar olarak iki ana grupta sınıflandırılırlar.

A. Uzun kodlanmayan RNA'lar

Nükleotit (nt) sayıları 200' den fazladır. Bu sınıfa ait RNA'lar ve fonksiyonları aşağıda özetlenmiştir.

B. Kısa kodlanmayan RNA'lar:

Nükleotit (nt) sayıları 200' den azdır.

Bu sınıflara ait RNA'lar ve fonksiyonları Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Düzenleyici kodlanmayan RNA'lar ve fonksiyonları

	Adı	Fonksiyonu
Uzun kodlanmayan RNA'lar	lincRNA (long intercoding RNA)	Embriyonik pluripotent hücrelerinin üreme hücrelerine farklılaşmasında ve transkripsiyonunda görev alır (57)
	ceRNA (competing endogenous RNA)	miRNA'ların hedeflerine bağlanmalarını düzenler (61)
	Xist ve Tsix RNA	X kromozomunun inaktivasyonunda görev alırlar (57)
Kısa kodlanmayan RNA'lar	tmRNA (transfermessenger RNA)	Yarısı mRNA'dan, yarısı da tRNA'dan oluşan hibrit bir moleküldür. Bazı proteinlerin sinyallerinin azaltılmasında işlev gören tmRNA'lar ribozomların kırık mRNA'lardan arınmasını sağlar (57)
	piRNA (Piwi-interacting RNA)	Germ hücrelerinde transpozon baskılanması ve DNA metilasyonunda görev alır (62)
	siRNA (Küçük interferans RNA)	Hedef genin mRNA'sına bağlanarak, mRNA'nın yıkılmasına yol açar ve gen ekspresyonuna engel olur (59)
	snRNA (Küçük nükleer RNA, small nuclear RNA)	Primer genomik transkriptlerden intronların birleştirilmesinde önemli roller oynamaktadır (59)
	snoRNA (Küçük nükleolar RNA, small nucleolar RNA)	rRNA, tRNA ve snRNA'ların kimyasal modifikasyonlarında görevlidirler (63)
	miRNA (mikro RNA)	Çoğalma, farklılaşma ve apoptoz düzenlemesinde rol oynar (64)

2.6.3. MikroRNA'lar

MikroRNA'lar (miRNA) 20-25 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan ve gen ifadesini transkripsiyon sonrası kontrol eden kısa RNA'lardır (65, 66). Yaklaşık olarak

insanlarda protein kodlayan genomun yüzde 30'unun miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir (66). Hedef mRNA'daki komplementine göre ya hedef mRNA'ların 3' translayona uğramayan bölge (untranslated region, UTR)'lerine bağlanarak protein üretiminde (translasyonel) baskılama yaparlar ya da hedef mRNA'yı keserek gen ekspresyonunu azaltırlar (65-67). Bunun sonucu olarak miRNA'lar hücre proliferasyonu, gelişimi, farklılaşması, kök hücrenin yenilenmesi, hücre stres yanıtları, apoptozis ve metastaz gibi pek çok biyolojik süreçlerde düzenleyici olarak işlev görmektedir. Ayrıca bazı miRNA'ların onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak da işlev gördükleri saptanmıştır (65, 68).

2.6.4. MikroRNA'ların keşfi

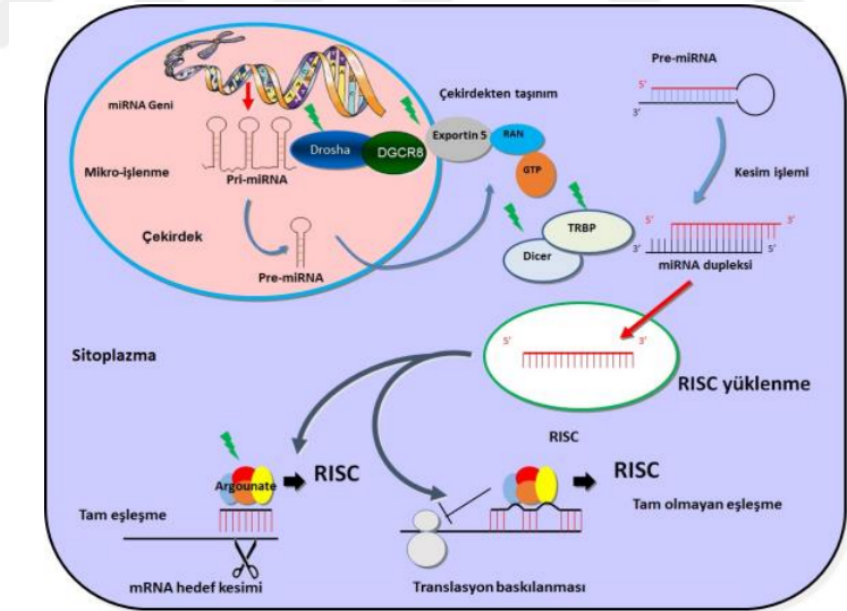
İlk miRNA olan lin-4, 1993 yılında toprak solucanı *Caenorhabditis elegans* (C. Elegans) ile yapılan çalışmalarla keşfedilmiştir (67). Lin-4 miRNA' sının, hedef geni olan Lin-14 ekspresyonunu azalttığı, ancak lin-14 mRNA seviyesinde bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Lin-14 mRNA'sı farklı türlerin embriyosunda ve *Caenorhabditis elegans* (C. elegans) adlı bir solucanın 1. larva aşamasında bulunan lin-14 proteinini kodlamaktadır. Lin-4 miRNA' sı ile lin-14 proteininin baskılanması sonucunda 1. larva aşamasından 2. Larva aşamasına geçişe neden olan bir model ortaya çıkmıştır (69, 70) (M25, M26). Daha sonra geç larva döneminden yetişkin hücre dönemine geçişe izin veren let-7 keşfedilmiştir. Let-7 ise lin-41 geninin translasyonunu baskılayan 21 nükleotidlik düzenleyici bir RNA kodlamaktadır. Yapılan çalışmalarla let-7'nin insan ve diğer türlerde de varlığı tespit edilmiştir (67). Daha sonra, gelişim aşamalarından ziyade sadece belli hücre tiplerinde ifade edilen, 21 nükleotidlik, küçük düzenleyici RNA'lar *Drosophila melanogaster* (*sirke sineği*) keşfedilmiş ve bu küçük düzenleyici RNA'lar mikroRNA'lar olarak isimlendirilmiştir (71).

2.6.5. MikroRNA'ların biyogenezi

MikroRNA'lar, birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonunda meydana gelmektedir. İlk aşamada miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşmektedir. İkinci adımda, pri-miRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara dönüştürülmektedir. Üçüncü ve son aşamada ise, olgun miRNA oluşmaktadır. Birinci ve ikinci aşama çekirdek içerisinde oluşurken, üçüncü aşama ise sitoplazmada gerçekleşmektedir. MikroRNA'lar, RNA polimeraz II enzimi tarafından primer transkript olarak genomik DNA'dan sentezlenmektedir. Pri-miRNA (500-3000 baz), 'cap' ve 'poli

A' kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısından oluşmaktadır. Çekirdekte pri-miRNA, Drosha ve kofaktörü Pasha proteinleri (DGCR8) tarafından yaklaşık olarak 60-110 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'lara dönüşmektedir (72, 73).

Pre-miRNA molekülü bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RNA-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınmaktadır (74, 75). Daha sonra sitoplazmik ribonükleaz III enzimi Dicer ve çift zincirli RNA bağlanma proteini olan TRBP (transactivation-responsive RNA-binding protein) tarafından ilmek kısmından kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli olgun miRNA' (miRNA dubleks) 'ya çevrilmektedir. (76, 77). Bu işlem sırasında Dicer RNA, indüklenmiş susturma kompleksi olan RISC (RNA-induced silencing complex) oluşumunu başlatmaktadır. Daha sonra bir helikaz ile miRNA sarmalı ayrıştırılmakta argonaut ailesi protein üyeleri yardımıyla RISC kompleksine dahil edilmektedir. miRNA'lar RISC kompleksine dahil olduktan sonra tamamlayıcısı oldukları mRNA ile baz eşleşmesi yapmaktadır. Bu eşleşmeden sonra, kompleks içindeki argonaute proteinleri mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olmaktadır (78).



Şekil 2.4. MikroRNA yolağı (79)

miRNA: mikroRNA, DGCR8: DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8, Drosha: RNAaz III enzimi, GTP: guanozin trifosfat, RAN: RAS-ilişkili Nükleer protein, RISC: RNA indüklenmiş susturma kompleksi, pri-mikroRNA: primer mikroRNA, TRBP: RNA-bağlanma proteini.

2.6.6. MikroRNA'ların fonksiyonları

MiRNA'lar solucan, sinek ve memelilerin bütün genlerinin yüzde 1-2'sini oluşturmaktadır (80). Her bir miRNA'nın birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu etkileyebilmekte ve tam tersi her bir mRNA da birden fazla miRNA tarafından hedeflenebilmektedir. Bundan dolayı her biyolojik süreç miRNA bağımlı düzenlemeyle karşı karşıya kalmaktadır. (81, 82).

MikroRNA'lar fonksiyonlarını kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef mRNA'ları tanıma özelliği sayesinde gerçekleştirirler. miRNA'lar, hedef mRNA'larının 3' translyasyona uğramayan bölgelerine (3'UTR) olan komplementerlik derecelerine bağlı olarak ya hedef mRNA'nın yıkımına ya da protein translyasyonunun baskılanmasına neden olurlar (83). MiRNA'ların hedef mRNA ile komplementerliği tam ise mRNA'nın parçalanmasıyla, komplementerlik daha az ise translyasyonun baskılanmasıyla sonuçlanır (84).

MiRNA'lar fizyolojik koşullar altında gen ifadesinin düzenlenmesine orta düzeyde katkı sağlamaktadır ve gelişme, farklılaşma, sağkalım, apoptozis, yaşlanma ve metabolizma gibi çeşitli biyolojik olayların kontrolünde görev almaktadırlar (85-87). Hastalık, stres gibi durumlarda miRNA'lar suprafizyolojik düzeylere çıkmakta ve etkileri fenotipe yansımaktadır (88).

2.6.7. MikroRNA'ların isimlendirilmesi ve genomik yerleşimi

Prekürsör miRNA'lar 'mir' ön ekini alırken olgun miRNA sekansları 'miR' ön ekini almaktadır. Benzer veya aynı sekanslara sahip olanlara aynı numara verilmektedir. Örneğin miR-146a dizisi miR-146b dizileri benzer oldukları için a ve b şeklinde ayrılmışlardır. Benzer sekanslardaki ayırım ise bir numara veya bir harf ile sonlanmaktadır. Buna karşın iki ayrı kromozomda kodlanan miR-16-1 ve miR-16-2 aynı sekanslara sahiptir ve sırasıyla 13. ve 3. kromozomda kodlanmaktadır (89).

miRNA'lar bir öncül diziden köken almaktadır. Yapılan çalışmalar transkripsiyon ünitesi içinde yerleşik olduklarını göstermektedir. Genomik yerleşimlerine göre miRNA'lar gen içi (intergenik), genler arası (intragenik) ve polisitronik olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır. Genler arası miRNA'lar; intronik, ekzonik, 3'-UTR miRNA'lar ve 5'-UTR miRNA'lar olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Gen içi miRNA genleri bulundukları genin aynı zinciri üzerinde yerleşirken bir kısmı da karşı zincire yerleşmektedir. miRNA genlerinin yaklaşık yüzde 70'i intronlarda yerleşmiştir. miRNA'ların büyük bir kısmı

kümelenmiş halde bulunmakta ve bağımsız bulundukları genin promotörlerini kullanarak ya da üzerindeki bulundukları gen ile beraber ifade edilmektedir. Dolayısıyla miRNA'lar yapısı ve yerleşimlerine göre fonksiyonları değişmektedir (90).

2.6.8. Belirteç olarak miRNA'lar

MikroRNA'lar vücut sıvıları ve dokularda yüksek stabilite gösterdiğinden dolayı günümüzde yeni nesil dizileme ve Real-Time PCR cihazları ile kolaylıkla analiz edilebilmektedir. MikroRNA'ların stabilitesi, endojen RNAz aktivitelerinden korunabilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu sayede formalin ile fikse edilmiş parafin gömülü dokularda dahi analiz edilebilmektedir. Dolayısıyla herhangi bir dokudaki miRNA ifadeleri veya dokulardan dolaşıma salınan miRNA'lar herhangi bir hastalık ya da patofizyolojik durumda belirteç olarak kullanılabilir. İlk defa diffüz büyük B hücreli lenfoma hastalarını tanımlamak için dolaşımdaki miRNA'lar kullanılmıştır (91). Bu çalışmadan sonra farklı hastalıklarda da miRNA düzeylerinin değiştiği gösterilmiştir. miRNA'ların belirteç olarak değerlendirildiği hastalıkların başında kanser gelmektedir. Günümüze kadar kanser ile ilişkili olarak birçok miRNA ekspresyonları değerlendirilmiş ve kanser tiplerini ayırmada, ön görmede, teşhisde ve hastalığın seyrini izlemede etkili olan miRNA'lar belirlenmiştir. MikroRNA ekspresyon değerlendirmeleri kanser dışında kardiyavasküler hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve sinir sistemi hastalıkları gibi birçok hastalıkta da çalışılmış ve bazı miRNA'ların belirteç olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir (92-99). Çeşitli hastalık durumlarında belirteç olarak değerlendirilen miRNA'lar Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Bazı hastalıklardaki miRNA belirteçleri

MikroRNA Belirteç	Hastalık
miR-181	Akut Miyeloid Lösemi (92)
Let-7	Kanser, Şizofreni ve Depresyon (93, 94)
miR-208	Miyokardial Hasar (95)
miR-21	Akciğer, Karaciğer, Pankreas Gibi Birçok Kanser Türü (96)
miR-143, miR-145	Prostat Kanseri (97)
miR-455-3p	Alzheimer Hastalığı (98)
miR-155	Otoimmün Hastalıklar (99)

2.7. Kardiyovasküler Hastalıklarda MikroRNA'lar

MikroRNA'lar kardiyovasküler hastalıklarda da incelenmiş ve hastalığın patofizyolojisi moleküler düzeyde belirlenmeye çalışılmıştır. Kardiyospesifik miRNA'lar (miR-1, miR-133, miR-208 ve miR-499) belirlenmiş ve 'kardiyak remodelling' süreçlerine olan katkıları gösterilmiştir (6). Yapılan çalışmalardan en dikkat çeken kardiyak öncül hücrelerden salgılanan miR-133 düzeylerinin kalp yetmezliği durumlarında azaldığının gösterildiği çalışma olmuştur (100, 101). MiR-21'in kardiyak fibrozise sürecinde rol oynadığı (102) , miR-1'in kalbin ritmini oluşturan ve pacemaker aktiviteyi düzenleyen etkiye sahip olduğu (103) ve miR-208'in kalbin kasılıp gevşemesini sağlayan α ve β miyozin hafif zincirlerinin (MHC) arasındaki dengeyi sağladığı (104) tespit edilmiştir. Kardiyovasküler hastalıklarda rol oynayan miRNA'lar ve hedefledikleri genler Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Kardiyovasküler hastalıklarda rol oynayan miRNA'lar ve hedefledikleri genler

	miRNA	Hedef Genler
Kardiyak Gelişim (105)	miRNA-1	MyoD, Hand2
	miRNA-133	Mef2
	miRNA-30c	CTGF
Kardiyak Hipertrofi (106)	miRNA-208	THRAP1, Myostatin
	miRNA-21	SPRY2
	miRNA-199	Dyrk1a, Hif-1a, Sirt1
	miRNA-1	RASGAP, MEF2A, GATA4
	miRNA-29	TGFB3
	miRNA-143	ACE2
	miRNA-133	Nelf-A/WHSC2, Rho
	miRNA-21	Spry1, PTEN
Kardiyak Fibrozis (107)	miRNA-133	CTGF
	miRNA-29	COL4A5
Kardiyak Aritmi (5)	miRNA-1	KCNJ2, GJA1
	miRNA-133	KCNQ1 ve SRF
	miRNA-212	Kir2.1
	miRNA-17-92	Pitx2
	miR-106b	Pitx2
	miRNA-150	AT1R
Kardiyak Rejenerasyon (108)	miRNA-15a	Chek1
	miRNA-17-92	PTEN
	miRNA-208	β MHC

2.7.1. Kalp yetmezliğinde miRNA'lar

Hücresele düzeyde kalp yetmezliği, kardiyomiyosit disfonksiyonu ve ekstrasellüler matriks (ECM) birikimine bağılı gelişen fibrozis nedeniyle oluşmaktadır. Bu süreçler

standart kalp yetmezliği tedavi rejimleri tarafından neredeyse tamamen tedavi edilmemektedir (109).

miR-133 kardiyomiyositlerde yüksek miktarda bulunmaktadır. Ancak, transvers aortik daralma yöntemi ile oluşturulan hipertrofik hayvan modellerinde ve hipertrofik kardiyomiyopati hastalarda düzeylerinin azaldığı bulunmuştur. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile miR-133'ün inhibe edilmesinin hipertrofiyi arttırdığı, miR-133'ün aşırı ifadesinin ise kardiyak fonksiyonu iyileştirdiği görülmüştür (101). miR-133a'nın kardiyak aşırı ekspresyonunun beta1-adrenerjik reseptör (β 1-AR) sinyalleme yolağındaki birkaç geni düzenleyerek apoptozu ve fibrozisi azalttığı bulunmuş ve miR-133 ekspresyon düzeylerinin de kardiyak aksiyon potansiyelini etkilediği gösterilmiştir (110).

miR-1, kardiyospesifiktir ve miR-133 ile aynı kümede bulunmaktadır. Kalp yetmezliği hastalarında düşük ifade edildiği bulunmuştur (111). Kalpte pacemaker aktivitesinden sorumlu tutulmaktadır. İfadesinin arttığı veya azaldığı durumlarda elektrofizyolojik anormalliklerin ortaya çıktığı gösterilmiştir (112). MikroRNA-1 insülin benzeri büyüme faktörü-1'i hedeflerken, insülin benzeri büyüme faktörü-1 pre-miR-1 transkriptinin işlenmesini baskılamaktadır (111). İnsülin benzeri büyüme faktör-1 yolağı kardiyak hipertrofiye ve aritmiye önemli katkılar sağlamakla birlikte, artan miR-1 düzeylerinin kardiyak fonksiyonu arttırdığı gösterilmiştir (113).

Kardiyomiyositlerde yüksek miktarda bulunan miR-208, α - ve β - MHC genlerinin üzerinde kodlamaktadır. Kalbin enerji tüketiminde, elektriksel iletide ve kardiyak hipertrofinin düzenlenmesinde önemli role sahiptir (114). MikroRNA-208'in nakavt edildiği farelerde ve anti-miR-208 ile sistemik olarak tedavi edilen sıçanlarda çeşitli stres koşullarında kalpte hipertrofi ve fibrozis gelişmediği görülmüştür (115). Kalp yetmezliği olan hastalarda kontrol grubuna göre arttığı bulunmuştur (116). miR-208 inhibisyonu kalp yetmezliğinde koruyucu tedavi olarak önerilmektedir. Bununla birlikte, miR-208 nakavt farelerinde, β -MHC ekspresyonunun değişmediği, bu da miRNA'ların etkilerinin hastalık durumlarında farklılaştığını göstermektedir (117). Ayrıca, insan kalplerindeki son derin sekans (deep sequence) verileri miR-208 ifadesinin miR-1 ve miR-133 gibi diğer kardiyak miRNA'lara kıyasla nispeten düşük olduğunu göstermektedir. Kalp yetersizliğinde miR-208 inhibisyonunu kullanan klinik öncesi çalışmalar 2011 yılında açıklanmış, ancak daha fazla ilerlememiştir (104).

2.7.2. Kardiyak fibrozisde miRNA'lar

Kardiyak fibrozis, fizyolojik doku mimarisinin ve progresif organ disfonksiyonunun tahrip edilmesine bağılı çeşitli yaralanmaların bir sonucudur (118). Histolojik olarak, fibroblastların aktivasyonu/proliferasyonu ve kollajen dahil olmak üzere aşırı matriks birikimi ile karakterize edilmektedir. Bu süreçte çeşitli büyüme faktörleri, proteolitik enzimler, anjiyojenik faktörler ve fibrojenik sitokinler rol oynamaktadır. Fibroziste rol oynayan genleri düzenleyen miRNA'lar son yıllarda keşfedilmiştir. MikroRNA-29' un, kollajen tip 1A1, kollajen tip 1A2, kollajen tip 3A1 ve fibrillin 1 gibi kollajen genlerini hedefleyerek, MI sonrası hücre dışı matris birikmesine neden olduğu gösterilmiştir. Spesifik olarak, MI'dan sonra miR-29 ailesi *in vivo* olarak downregüle edildiğinde, hedeflenen genlerin baskılanması engellenmiş ve kardiyak fibrozis gelişmiştir (119).

Fibrozis ile ilişkili miRNA'lardan biri de miR-21'dir. MikroRNA-21, kardiyak fibroblastlarda yüksek miktarda bulunmakta ve sprouty homolog 1 genini inhibe ederek mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağını düzenlemektedir. Böylece fibroblastların hayatta kalmasını ve büyüme faktörü sekresyonunun devam etmesini sağlamaktadır. MikroRNA-21, spesifik bir antagonist ile inhibe edildiğinde, MAPK sinyal aktivitesini azaltarak interstisyel fibrozisi azalttığı ve kardiyak disfonksiyonu düzelttiği bulunmuştur (102).

Fibrozis ile ilişkili miRNA'lardan bir diğeri de miR-133a'dır. Anjiyotensin II ile indüklenen kardiyak fibrozis ve hipertansiyonda miR-133a'nın downregüle olduğu ve kollajen tip 1A1'in ifade düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir (107).

2.7.3. İskemik kalp hastalığında miRNA'lar

Akut MI' ın en korkulan komplikasyonlarından biri iskemi reperfüzyonu (I/R) hasarıdır. Vakaların %30' dan fazlasında görülmekte ve kötü prognozla ilişkili olduğu belirtilmektedir (120). Çeşitli patolojik süreçler miyokardiyal I/R hasarına katkıda bulunmaktadır. Hipoksi ve sonucunda gelişen oksidatif stres, protein modifikasyonlarına, lipid oksidasyonlarına ve DNA kırılmalarına neden olmakta ve hücre içi ve hücre içi doku bileşenlerini etkileyen zararlı yanıtlar zincirini tetiklemektedir: endotelial disfonksiyon, endotele nötrofil yapışması ve transendotelial migrasyon, inflamatuvar mediatörlerin salınımı, hücrel kalsiyum aşırı yüklenmesi ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşmektedir (121). Son zamanlardaki ilerlemelere rağmen, miyokardiyal I/R hasarı ile ilişkili altta yatan moleküler sinyaller tam olarak aydınlatılamamıştır. Birkaç çalışma, anahtar

sinyalleme elemanlarını değiştirerek miRNA'ların I/R hasarına katkıda bulunduğunu ileri sürmüştür. Bunların arasında miR-21, miR-320a, miR-181a-5p ve miR-199a/b bulunmaktadır (122, 123).

2.7.3.1. miR-21

MikroRNA-21 geni kromozom 17q23.2'de ve transmembran protein 49 (TMEM49)'un protein kodlayan bölgesinde lokalizedir. Bağımsız olarak kendi intronik promoterinden transkribe olmaktadır. Transmembran protein 49 geni vakuol membran proteini 1 (VMP1) olarak da bilinmekte olup stres koşullarında otofajinin başlamasında ve devam etmesinde etkilidir (124). MikroRNA-21 kalp, dalak, ince bağırsak ve kolon gibi memeli organ sistemlerinde eksprese olmaktadır. Bir onkogen gibi fonksiyon gösterdiği tespit edilen ve oncomir sınıfında yer alan miR-21'in birçok kanser türünde yüksek seviyede eksprese olduğu tespit edilmiştir (125, 126). miR-21 kanser hücrelerine ek olarak vasküler düz kas hücreleri, endotelyal hücreler, kardiyomiyositler, kardiyak fibroblastlar ve angiojenik projenitör hücreler gibi kardiyovasküler hücrelerin bütün tiplerinde yoğun olarak eksprese edilmektedir (127). MikroRNA-21'in kardiyovasküler biyolojisi ve hastalıklardaki rolü son 10 yılda önem kazanmıştır (128). Kardiyovasküler hastalıklar ağıısından miR-21 değerlendirildiğinde ekspresyon düzeyleri 4 ana başlık altında sınıflandırılmaktadır: Proliferatif vasküler hastalık, kardiyak hipertrofi, kalp hasarı ve iskemik kalp hastalığı. MikroRNA-21'in rolünün değerlendirildiği kanser ve kardiyovasküler hastalıklarda miR-21'in ifade düzeylerinin artması ile eř zamanlı olarak sprouty-1 (SPRY1) (129, 130), sprouty-2 (SPRY2) (131, 132), fosfataz ve tensin homologu (Phosphatase and tensin homolog, PTEN) (133, 134), programlanmış hücre ölüm proteini 4 (Programmed cell death protein, PDCD4) (135, 136), peroksizom proliferatör-aktif reseptör α (PPAR α) (137, 138) ve tropomiyozin (TM) (139, 140) genlerinin baskılandığı görölmektedir. Yapılan alışmalar bahsedilen genlerin miR-21'in fonksiyonel hedefi olduğunu göstermektedir.

MikroRNA-21'in neointimal lezyon oluşumunun dahil olduğu proliferatif vasküler hastalıkların patojenezinde de önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu konuda yapılan yapılan çeşitli *in vivo* ve *in vitro* alışmalarda miR-21'in vasküler düz kas hücrelerinde anti-apoptik ve proliferatif etkiye sahip olduğu ve bunun sonucu vasküler neointimal büyümeye neden olduğu gösterilmiştir (141). Moleküler mekanizmalara bakıldığında miR-21'in vasküler düz kas hücrelerinde oluşturduğu bu hücresel etkilerden miR-21'in fonksiyonel hedefi olan PTEN ve PDCD4 genleri sorumlu tutulmaktadır. PTEN geni

vasküler düz kas hücreleri yanında kardiyomiyositler, fibroblastlar ve endotel hücrelerinde eksprese edilerek hücre canlılığı, apoptozis, hipertrofi, kontraktilite ve metabolizmayı modüle etmekte ve birçok kardiyovasküler hastalığın gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır (142). PDCD4 geni ise bir tümör supresör genidir ve son dönemlerde antikanser tedavi için potansiyel hedef olarak tanımlanmıştır. Kardiyovasküler biyolojiyi kapsayan çalışmalarda PDCD4 geninin vasküler düz kas hücrelerinin ve kardiyak hücrelerin apoptozisinin düzenlenmesinde rolü olduğu ortaya konmuştur (143).

MikroRNA'lar kardiyak hücrelerin büyümesi ve farklılaşmasında önemli düzenleyici rollere sahiptir. Dolayısıyla kalp hasarı ve kalp hipertrofisinde de önemli etkilere sahip olabilmektedir (144, 145). Yapılan çalışmalarda miR-21'in hipertrofik hayvan kalplerinde önemli derecede upregüle olduğu bulunmuştur (146). MikroRNA-21'in kardiyak miyositlerdeki ekspresyon düzeylerinin yenidoğanlarda daha yüksek olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla miR-21'in ifadesi kardiyak miyositlerde gelişimle ilişkili düşünülmektedir (147). Yapılan bir çalışmada anjiyotensin II ve fenilefrin ile uyarılan neonatal hipertrofik kardiyomiyositlerde miR-21 düzeylerinin aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir (148). Başka bir çalışmada, β -aderenerjik reseptör (β AR) uyarılmasının indüklediği kardiyomiyosit büyümesinin miR-21 inhibisyonu ile bloke olduğu ortaya konmuştur. Buna karşın miR-21'in aşırı ekspresyonu ile de kardiyomiyosit büyümesi önemli ölçüde artmıştır. MikroRNA-21 aracılı kardiyomiyosit büyümesi, hedef geni olan "sprouty RTK (reseptör tirozin kinaz) antagonist 2 (SPRY2)" ile gerçekleşmektedir. SPRY2 geni sprouty gen ailesinden birisidir ve reseptör tirozin kinaz ile oluşturulan sinyali belirli koşullarda inhibe ederek hücre büyümesi ve göçünü engellemektedir (149). SPRY2 geni aynı zamanda PTEN ifadesini arttırmaktadır (150). Fibroblast büyüme faktörü bağlamında SPRY2 diğer izoformları ile karşılaştırıldığında Ras/ERK yolağının en belirgin inhibitörü olmaktadır (151). Yetişkin farelerde antagomir yaklaşımı ile miR-21'in downregüle edilmesi hipertrofinin indüklediği koşullar altında kardiyomiyosit çapını ve kalp ağırlığını azaltmaktadır (152).

MikroRNA-21 kardiyomiyositlerden ziyade kardiyak fibroblastlarda daha fazla eksprese edilmektedir. Hasarlı kalp dokusunun fibroblastlarında miR-21'in önemli ölçüde eksprese edildiği bulunmuştur. Kardiyak strese bağlı yanıtta miR-21'in upregüle olmasının ERK-MAP kinaz sinyalini arttırdığı, fibroblast proliferasyonuna ve fibrozise yol açtığı bulunmuştur. Tersine kardiyak hipertrofisi ve hasarının oluşturulduğu fare

modelinde, antagomir miR-21'in susturulmasının kardiyak ERK-MAP kinaz aktivitesini azaltarak intersitisyel fibrozisi inhibe etmiş ve kardiyak disfonksiyonu azalttığı bulunmuştur. MikroRNA-21 inhibisyonu sadece kardiyak hipertrofiyi önlemekle beraber stresin oluşturduğu kardiyak etkiyi tersine çevirmektedir. Dolayısıyla SPRY1, hem Ras/MEK/ERK yolağının potent inhibitörü hem de miR-21'in direk hedefi olarak bulunmuş ve kardiyak fibroblastlarda miR-21'in etkilerine aracılık ettiği sonucuna ulaşılmıştır (153).

Bir çalışmada AMI'nın geç fazında (AMI'dan 3 ve 14 gün sonra) önemli miRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve miR-21, miR-214 ve miR-223 ekspresyonlarının kalbin infarktli bölgesinin sınırlarında arttığı bulunmuştur (154). Yapılan başka bir çalışmada, AMI erken fazında kardiyak miRNA ekspresyon düzeyleri belirlenmiş ve infarktli bölgede miR-21 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı bulunmuş, ancak infarktli sıçan kalbinin sınır bölgelerinde AMI'dan 6 ve 24 saat sonra miR-21'in upregüle olduğu görülmüştür. Çalışmada adenovirus gen transferi ile miR-21'in aşırı ifadesi sağlanmış ve AMI'dan 24 saat sonra miyokardiyal infarkt boyutunun azaldığı gösterilmiştir (155). Yin ve ark. tarafından I/R'nin indüklediği kalp hasarlarına karşı miR-21'in koruyucu etkileri in vivo olarak tanımlanmıştır (156).

MikroRNA-21'in insan kardiyovasküler hastalıklarındaki etkileri ortaya konulmuştur. Semptomatik kalp yetmezliği olan 61 hastada, hastalığın şiddeti ile miRNA düzeyleri değerlendirilmiştir. NT-proBNP (pro-brain natriüretik peptid, pro-beyin natriüretik peptid) ve galektin-3 konsantrasyonlarının ölçüldüğü bu çalışmada miR-1 düzeylerinin hastalığın şiddeti ile azaldığı, buna karşın miR-21 düzeylerinin hastalığın şiddetinden bağımsız olarak tüm hastalarda görüldüğü ve miR-21'in galektin-3 konsantrasyonu ile korelasyon gösterdiği ortaya koyulmuştur (157). Valvüler kalp hastalığından dolayı kalp yetmezliği olan 60 hasta ve 60 sağlıklı gönüllünün katıldığı bir çalışmada miR-21 ve miR-423-5p düzeyleri değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda valvüler kalp hastalığı olan hastalarda miR-21 ve miR-423-5p ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı görülmüştür (158). Kronik kalp hasarı olan hastalarda, akut aşırı egzersizin serumdaki miRNA düzeylerine olan etkisinin incelendiği 28 hastanın dahil olduğu bir çalışmada, miR-21, miR-378 ve miR-940 düzeylerinin önemli ölçüde arttığı, bu miRNA'daki değişimlerin egzersiz kapasitesi, kas hasarı ve inflamasyonla alakalı önemli bir korelasyon göstermediği bulunmuştur (159). Kardiyak cerrahiye giden kalp hasarı olan ve olmayan 34 Çinli hastadan alınan miyokard doku biyopsilerinde

apoptozis, hipertrofi ve fibroziste rol oynayan miR-1,-21,-23,-29,-130,-195,-199 düzeylerinin kalp hasarı grubunda önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (160). Başka bir çalışmada ise, dilate kardiyomiyopatili hastalarda fibrozisin serumdaki belirteçleri ile mikroRNA'lar arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmada dilate kardiyomiyopatili hastalar sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında miR-21, miR-26, miR-29, miR-30 düzeyleri arasında önemli derecede farklılık bulunmuştur. Çalışmada dolaşımdaki kollajen-1'in miR-21 ve miR-29 ile MMP-2'nin miR-21, miR-26, miR-29, miR-30 ve miR-133a ile güçlü bir şekilde ve TIMP-1'in miR-21 ve miR-133a ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (161). Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde miR-21'in kalp hasarında ve kardiyak remodelling sürecinde önemli etkilere sahip olduğu görülmektedir.

2.7.3.2. miR-320a

MikroRNA-320a 8. kromozomda kodlanan intergenik bir miRNA'dır. Kansere dahil birçok hastalıkta düzeyleri ifade edilmektedir (162-164). Son yıllarda miR-320a ile ilgili çalışmalar artmış olup kalp hastalıklarındaki önemi açısından çalışmalar yapılmıştır. Kalp hasarı gibi durumlarda düzeylerinin arttığı ve kalbin kötüleşmesinde rolü olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Akut göğüs ağrısı ile acile başvuran hastalarda dolaşımdaki miRNA düzeylerinin değerlendirildiği bir çalışmada 1155 hastada 6 miRNA'nın (miR-133a, miR-208b, miR-223, miR-320a, miR-451 ve miR-49) düzeyleri ölçülmüştür. Bu hastalardan AMI geçiren 224 hastada miR-208b, miR-499 ve miR-320a düzeylerinin diğer grup hastalardan önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak kardiyak troponin değerleri ile birlikte analiz edildiğinde miR-320a akut miyokard infarktüsün öngörülmesinde ve teşhisinde anlamlılık göstermemiştir (165). Aritmojenik kardiyomiyopatide eksprese edilen miRNA'ları tanımlamak için aritmojenik kardiyomiyopatili hastalar, sağlıklı gönüllüler ve idiyopatik ventriküler taşikardili hastalarda yaklaşık 377 miRNA ekspresyonu değerlendirilmiştir. Aritmojenik kardiyomiyopatili hastalarda miR-320a düzeyleri, gerek sağlıklı gönüllüler, gerekse de idiyopatik ventriküler taşikardisi olan hastalara göre daha düşük düzeyde bulunmuştur. Yapılan bu çalışma ile miR-320a'nın hem aritmojenik kardiyomiyopati ile idiyopatik ventriküler taşikardinin teşhissel ayrımında etkili olabileceği, hem de aritmojenik kardiyomiyopatinin patojenezinde mekanistik rolü olabileceği sonucuna varılmıştır (166). Konjesitif kalp yetmezliği hastalarında arteriyal ve koroner sinüs kan örneklerindeki miRNA düzeylerinin ölçüldüğü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığı bir çalışmada miR-320a'nın upregüle olduğu gözlenmiştir (167). Başka bir çalışmada ise,

miR-320a'nın bir kardiyak transkripsiyon faktörü olan serum yanıt faktörü (SRF)'nü downregüle ettiği ve aterojeneneze katkısının olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu çalışmada, miR-320a düzeyleri sağlıklı gönüllülere kıyasla koroner arter hastalarında daha yüksek bulunmuştur. Çalışmada ApoE^{-/-} farelerinde, miR-320a vektör ile tranfekte edilerek aşırı eksprese edilmesi sağlanmış plazma lipid düzeylerinde (total kolesterol, LDL, trigliserid) önemli artışlar görülmüştür. Yine bu farelerin miR-320a ekspresyonunun endotel hücre fonksiyonunu azalttığı ve aterojenezi ilerlettiği tespit edilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucu miR-320a'nın SRF'nin potansiyel bir hedefi olduğu tanımlanmış ve yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile onaylanmıştır. Bununla birlikte miR-320a ekspresyonunun insan türevli endotel hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği bulunmuştur (168). Yapılan bir başka çalışmada, miR-320a'nın VEGF (mRNA) sinyal yolağını hedefleyerek doksorubisinin indüklediği kardiyotoksisiteye aracılık ettiği gösterilmektedir (169). Stabil kronik sistolik kalp yetmezliği olan 30 hasta ve 30 kontrol grubunda 186 miRNA'nın düzeyleri ölçülmüş ve iki grup arasında miRNA düzeylerindeki farklılıklar karakterize edilmiştir. Kalp hasarı olan grupta miR-423-5p, miR-320a, miR-22 ve miR-92b düzeylerinde önemli artışlar görülmüştür. Yapılan analizlerde hastalar kontrol grubundan yüzde 90 spesifikite ve duyarlılık ile ayrılmıştır. Yapılan çalışma ile yükselen spesifik miRNA düzeylerinin klinik prognostik parametrelerle korele olduğu ve sistolik kalp yetmezliği olan hastaların belirlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (170).

2.7.3.3. miR-181a

MikroRNA-181 ailesi miR-181a, 181b,-181c,-181d olmak üzere dört miRNA'dan oluşmaktadır. Bu aile farklı transkriptler ile kodlanmakta ve 3 ayrı kromozomda lokalize olmaktadır. MikroRNA-181 ailesi farklılaşma, hematopoez, immün modülasyon, kanser gibi çeşitli biyolojik olaylarda önemli role sahiptir oluşmaktadır. MiR-181 ailesi farklı transkriptler ile kodlanmakta ve 3 ayrı kromozomda lokalize olmaktadır. MiR-181 ailesi (171). MiR-181a ve miR-181b, miR-181 ailesinin en çok çalışılan miRNA'larıdır (172). Bir çalışmada, miR-181a-5p'nin aterosklerotik plaklarda normal damarlar ile karşılaştırıldığında upregüle olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada hidrojen peroksit (H₂O₂) ile tedavi edilen endotel hücrelerinde miR-181a'nın indüklendiği ve endotel hücrelerinde apoptoz hızını arttırdığı gösterilmiştir. MikroRNA-181a'nın inhibe edilmesiyle de bir antiapoptik protein olan bcl-2 düzeylerinin eski haline dönmesi miR-181a ve bcl-2 arasında ters bir korelasyon olduğu göstermiştir (173). AMI hastalarında miR-181a'nın

dolaşımdaki düzeyleri zamana bağlı ölçülmüş ve kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada hasta grubunda miR-181a düzeylerinin kreatinin kinaz-MB ve kardiyak troponin I ile pozitif, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (123). Nörojenik hipertansiyon modelinde miR-181a mimiklerinin renin-anjiyotensin sistemini inhibe ettiği ve hipertansiyonu azalttığı gösterilmiştir (174).

2.7.3.4. miR-199 ailesi

MikroRNA-199 ailesi miR-199a ve 199b olmak üzere 2 üyeden oluşmaktadır. MiR-199a ve miR-199b aile üyeleri (miR-199a/b) dynamin (DNM) genlerinin intronlarında kodlanmaktadır. miR-199a/b ailesi sırasıyla DNM2, DNM3 ve DNM1 genlerinde lokalize olan miR-199a1, miR-199a2 ve miR-199b üyelerinin bileşiminden oluşmakta ve sırasıyla kromozom 9, 1 ve 2 üzerindeki farklı bölgelerden transkribe olmaktadır. MikroRNA-199a/b-5p gen sekansları türler arasında ve miR-199a/b-3p ile karşılaştırıldığında daha yaygın olduğu görülmektedir (175, 176).

2.7.3.5. miR-199a

Kalple ilişkili miRNA'lerden birisidir. Beyin, karaciğer, mide, over, testis ve kardiyovasküler sistemde, özellikle de kardiyomiyositlerde ve endotel hücrelerde eksprese olmaktadır. Aynı zamanda hem endotel hücre hem de kardiyomiyositlerin sağkalımlarının kontrolünde kritik rol oynamaktadır (177). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, kardiyomiyositlerde kardiyak bütünlüğü, fonksiyonu ve reperfüzyonun devamlılığını sağlayan “transkripsiyon aktivatör 3” (STAT3) geni nakavt edilmiş, azalmış STAT3 protein düzeyleri ile patofizyolojik ilişkinin kurulduğu, miR-199a-5p düzeylerinin arttığı, miR-199a-5p'nin doğrudan iki hedefi olan ubiquitin konjugasyon enzim (UBE2G1 ve UBE2I) düzeylerinin azaldığı ve bu enzimlerdeki azalmanın kardiyomiyosit sarkomer yapısını ve fonksiyonunu bozduğu gösterilmiştir (178). Bunun dışında miR-199a-5p ile bir transkripsiyon aktivatör proteini olan ‘hipoksiyle indüklenen faktör 1 α (Hif1 α)’ arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. Hif-1 α bütün hücre tiplerinde hipoksik koşullar altında indüklenen bir transkripsiyon faktörüdür ve hipoksi esnasında upregüle olan genlerin yüzde 89'unun transkripsiyonundan sorumludur. Bu genler arasında eritropoietin, VEGF, glukoz transpoter-1 (Glut-1), glikolitik enzimler, hemoksijenaz-1 (HO-1) ve indüklenebilir nitrik oksit bulunmaktadır. Şiddetli hipoksi durumlarında Hif-1 α aynı zamanda apoptozise aracılık etmektedir (179).

Bir çalışmada, hipoksiye veya iskemiye maruz kalan kardiyomiyositlerde miR-199a-5p'nin dakikalar içerisinde analiz edilemez düzeyde azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada miR-199a5p'nin Hif1 α ve sirtuin1 (Sirt1) genlerini dolaylı olarak hedeflediği ve inhibe ettiği, bununla beraber hipoksik koşullar altındaki miyositlerde miR-199a-5p düzeylerinin azalması için bu genlerin ekspresyonunun artmasının gerekli olduğu da gösterilmiştir. Ayrıca Hif-1 α 'nın negatif düzenleyicisi olan prolil hidroksilaz-2'nin Sirt1 tarafından proteozomal degradasyona uğradığı ve bu sayede Hif-1 α 'nın stabilize halde kaldığı bulunmuştur (180).

MikroRNA-199a-5p'nin downregülasyonu, hipoksinin neden olduğu hücre ölümlerinde majör role sahiptir. Kalp hasarının olduğu çeşitli modellerde miR-199a-5p'nin upregüle olduğu görülmektedir. Hipoksik hasardaki rolüne ek olarak kardiyak miyositlere miR-199a'nın transfeksiyonu hipertrofi ile sonuçlanmaktadır (181). Yapılan bir başka çalışmada miR-199a-5p'nin intraselüler trafiğin kontrolüne katkıda bulunduğu gösterilmiş ve endositozun önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada miR-199a-5p'nin LDL reseptörünün internalizasyonunu engelleyerek hücre içerisine LDL girişini engellediği gösterilmiştir (175).

Diğer formu olan miR-199a-3p tümörjenezis esnasında kanserli dokularda hem potansiyel bir tümör supresör hem de bir onkogen olarak rol oynamaktadır (182).

2.7.3.6. miR-199b

İnsan ve fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, miR-199b'nin kalp yetmezliğinde düzeyleri artan kalsinörin-aktifleştirilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (nuclear factor of activated T cells, NFAT) sinyal yolağı ile beraber çalıştığı ve kalsinörin gen ekspresyonuna katkıda bulunan nükleer NFAT kinaz'ın, dual-spesificity tirozin-Y-fosforilasyon düzenleyici kinaz 1a'yı (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase, DYRK) hedeflediği tespit edilmiştir (183). Kalsinörin-NFAT sinyal yolağı kalbin gelişiminde ve morfolojisinde önemli role sahiptir. Kalpte gelişen hipertrofi gibi patolojik durumlarda gen ifadesi değişerek kardiyak remodeling süreçlerine katkıda bulunmaktadır (184, 185).

Yapılan bir başka çalışmada, farelerde miyokard infarktüs sonrası miR-199b düzeylerinin aşırı ifade edildiği ve infarkt bölgesinin sınırlarında fibrozis geliştiği gözlenmiştir. MikroRNA-199b'nin farmakolojik olarak inhibe edilmesiyle de kalp fonksiyonunun iyileştiği gösterilmiştir (186).

İnsan pluripotent kök hücre türevli kardiyomiyositlerde miRNA ifadeleri üzerinde doksorubisinin erken ve geç etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, miR-34a, miR-34b, miR-187, miR-199a, miR-199b, miR-146a, miR-15, miR-130a, miR-214 ve miR-424'ün doksorubisin tedavisinden önce ve sonra farklı ifade edildiği bulunmuştur. Çalışmada doksorubisin tedavisinden sonra kardiyomiyositte meydana gelen hasara ve strese karşı miR-34a, miR-34b düzeyleri artarak DNA hasarına karşı koyarken miR-199a/b düzeyleri azaldığı tespit edilmiştir (187).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu'nun 2016/276 sayılı kararıyla tez çalışması olarak onay almıştır.

Çalışma 46 hasta ve 48 sağlıklı gönüllü üzerinde yapıldı. Gönüllülerin çalışmaya dahil edilmesi, periferik kanlarının alınması Sanko Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahi Anabilim Dalı'nda, plazma ayırma işlemleri ve RNA izolasyonu aşamasına kadar saklanma süreci Sanko Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya laboratuvarında, miRNA izolasyonu ve analizleri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (TF.DT.17.11).

3.1. Gönüllü Seçimi

Çalışma Sanko Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahi Anabilim Dalı'na daha başvurmuş 46 hasta ve 48 sağlıklı gönüllüler üzerinde yapıldı.

Hasta grubundaki gönüllülerin çalışmaya dahil edilme kriterleri;

- 18-65 yaş arası
- Koroner arter hastalığı teşhisi konulmuş,
- Miyokart infarktüs öyküsü olan,
- Koroner arter darlığı %70 den fazla olan,
- Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu %30 ile %55 arasında olan,
- Diabetes mellitusü olmayan,
- Malign hastalıkları olmayan ve
- Kronik böbrek yetmezliği olmayan

Kontrol grubundaki sağlıklı gönüllülerin çalışmaya dahil edilme kriterleri;

- 18-65 yaş arası
- Koroner arter hastalığı ve ilgili miRNA' ları etkileyebilecek rahatsızlığı olmayan

3.2. Plazma Örneklerinin Alınması ve Kodlanması

- Çalışma kapsamında, hasta grubu dahil edilme koşullarını sağlayan ve kardiyopulmoner bypass ameliyatı olmayı kabul eden 46 hastadan operasyon öncesi ve operasyon sonrası 1. ve 24. saatte periferik kan örnekleri alındı. Aynı klinikte hasta yakını olan, koroner arter hastalığı ve ilgili miRNA'ları etkileyebilecek rahatsızlığı olmayan ve çalışmaya katılmayı kabul eden 48 sağlıklı gönüllünün periferik kanları toplandı. Toplanan kanlardan elde edilen toplam 192 plazma örneği RNA izolasyonu gerçekleştirilmek üzere Sanko Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda -80 °C'de saklandı. Ayrıca hasta ve kontrol gruplarının kan örneklerine ait biyokimyasal parametreler (ldh, bun, glikoz, troponin I, ck, ve ck-mb) Sanko Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında ölçüldü.
- Plazma örnekleri operasyon öncesi (pre-op), operasyondan 1 saat sonra (OP1), operasyondan 24 saat sonra (OP24) ve kontrol grubu (K) olmak üzere 4 grup olarak kodlandı ve analiz edildi.

3.3. Gereçler

3.3.1. Kullanılan araçlar-gereçler, kimyasal ve sarf malzemeler

Çalışma boyunca kullanılan araç-gereç, kimyasal ve saf malzemeler aşağıda sıralanmıştır.

3.3.1.1. Kullanılan araç-gereçler

- Santrifuj (Eppendorf 5810R)
- -20 °C Derin Dondurucu (Arçelik)
- Real-Time PCR (Biomark Fluidigm System)
- Fluidigm HX IFC Controller
- Thermal Cycler (Bioer Genem Pro)
- Vorteks (İsolab)
- Mikropipet Seti (Viaflo İntegra)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Plate Karıştırıcısı (PKT Smart Mixer, Multi Shaker, JSH-03, SN: JMC-JSH03-1005, PhileKorea, Korea)
- Plate Santrifüjü (PKT Mini Multi-well plate centrifuje, JCW48, SN:PKT-JCW48-1057, PhileKorea, Korea)

3.3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri

- Qiagen miRNeasy RNA isolation kit (Katalog no: 217204)
 - ✓ Rneasy UCP MinElute spin kolonları
 - ✓ Toplama tüpleri (1.5 mL)
 - ✓ Toplama tüpleri (2.0 mL)
 - ✓ Tampon RPL
 - ✓ Tampon RPP
 - ✓ Tampon RWT
 - ✓ Tampon RPE
 - ✓ Rnaz içermeyen su
- Isopropanol (%100) (Merck)
- Etanol %80 (Merck)
- Qiagen miScript II Kit (Katalog no: 218161)
 - ✓ miScript Hispec buffer
 - ✓ miScript Nucleics mix
 - ✓ DNase-Rnase free su
 - ✓ miScript Revers Transkriptaz mix
- Qiagen miScript Microfluidics PreAmp Kit (Katalog no: 331455)
 - ✓ MiScript Preamp buffer
 - ✓ Hot start tag DNA polimeraz
 - ✓ Preamp primer pool
 - ✓ DNase-Rnase free su
 - ✓ miScript Preamp Universal Primer
- Qiagen miScript Primer Assay (Katalog no: 3312219)
- Qiagen miScript MicroFluidic PCR kit (Katalog no: 331431)
 - ✓ qPCR Master Mix
 - ✓ Microfluidic Universal Primer
- DNA Binding Dye (Fluidigm Katalog no:100-7609)
- Assay Loading Reagent (Fluidigm Katalog no: 100-7611)
- Piko Plate (Thermo Scientific, UK)
- Pipet ucu 1-10 µL (İntegra)
- Pipet ucu 2-30 µL (İntegra)
- Pipet ucu 10-100 µL (İntegra)

- Pipet ucu 20-200 µL (İntegra)
- Pipet ucu 100-1000 µL (İntegra)
- 0.2 mL Thermo-Strip (8'li strip tüp, Thermo Scientific, UK)
- 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpü (DNAz, RNAz'sız) (Thermo Scientific, UK)
- PCR Plate Film (Applied Biosystems)

3.4. MikroRNA Analizi

3.4.1. Plazma eldesi

Çalışma gruplarından %7.5 EDTA'lı tüplere alınan 5 mL'lik kan örnekleri yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılarak plazmaları ayrıldı.

- Tüpler 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonunda tüpler dikkatlice santrifüjden çıkartıldı.
- Plazmanın en üst kısmından 1000 µL olacak şekilde plazma toplandı.
- Toplanan 1000 µL'lik plazma 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve plazmanın en üst kısmından alttaki supernatana dokunmadan pipet ile (DNase , RNase Free, filtreli pipet uçları kullanılarak) 200 µL temiz bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Mikrosantrifüj tüpleri hastaya ait barkod etiketi ile etiketlendi.

Bu şekilde ayrılan plazma örnekleri -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

3.4.2. MikroRNA izolasyonu

MikroRNA'lar, plazmadan miRNA izolasyon kiti ile (Qiagen miRNeasy RNA İsolation Kit) izole edildi. İnternal kontrol olarak cel-miR-39 kullanıldı. MikroRNA izolasyonu kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Uygulanan prosedür aşağıda gösterilmiştir;

- Kiti kullanmaya başlamadan önce aşağıdaki sulandırmalar yapıldı.
 - ✓ RWT ve RPE tamponları kullanımdan önce, şişe üzerinde yazan hacimde %96-100 etanol eklendi.
 - ✓ Cel-miR-39 spike internal kontrol kullanımından önce tüpe 300 µL RNaz içermeyen su eklendi (2×10^{10} kopya/stok).
 - ✓ Sulandırılan bu tüp -80 °C'de porsiyonlanarak saklandı.

- ✓ 4 µL stok spike in kontrol üzerine 16 µL Rnase içermeyen su eklendi (4x10⁹ kopya/ µL).
- ✓ 2 µL 4x10⁹ kopya/ µL spike in kontrol üzerine 48 µL RNase içermeyen su eklenerek istenen hacimde gerekli kopya sayısına sahip hacimde spike in kontrol elde edildi (1.6x10⁸ kopya/ µL).
- Plazma örnekleri çözündürüldü.
- Mikrosantrifüj tüpüne 200 µL örnek eklendi.
- Örnek üzerinde 60 µL tampon RPL eklendikten sonra 5 saniye vorteks ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi.
- Tüpe 3.5 µL daha önce sulandırdığımız spike in kontrol (Cel-miR-39) eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı.
- Tüpe 20 µL tampon RPP eklendikten sonra tüp 20 saniye vorteks ile iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi.
- Tüp süre bitiminde 12000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve pelletin çökmesi sağlandı.
- Süpernatant, yaklaşık 230 µL yeni bir tüpe alındıktan sonra üzerine 1/1 hacimde isopropanol eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı.
- Kolonlara, tüpün tüm içeriği aktarıldı ve ≥8.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Tüpteki süzüntü atıldı.
- Kolona 700 µL tampon RWT eklendi ve ≥8.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Tüpteki süzüntü atıldı.
- Kolona 500 µL tampon RPE eklendi ve ≥8.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Tüpteki süzüntü atıldı.
- Kolona 500 µL %80'lik alkol eklenmiş ve ≥8.000 rpm'de (≥10.000 rpm) 2 dk santrifüj edilmiştir. Tüpteki süzüntü atıldı.
- Bu adımda, kolonu tüpten alırken süzüntü ile temas etmemesine dikkat edildi.
- Kolon paket içerisinde olan yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne alındı, tüp ağzı açık şekilde 5 dk maksimum hızda santrifüj edildi.
- Kolondan ethanolün tamamen uzaklaşması sağlandı.

- Kolonu paket içerisinde olan yeni bir 1.5 mL tüp içerisine aldı, membranın tam ortasına gelecek şekilde 20 µL RNase free sudan pipetlendi, tüp kapağı açık halde 1 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Süre bitiminde, tüp maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi ve RNA membrandan süzüldü.
- Bu işlem sonrasında protokolde yazıldığı üzere elde edilen RNA miktarı yaklaşık 18 µL oldu.

3.4.3. cDNA reaksiyonunun hazırlanması

Bu aşamada izole edilen RNA'lar tamamlayıcı DNA (complementary DNA, cDNA)'ya çevrildi. cDNA çevirme aşamasında Qiagen miScript II kiti kullanılarak cDNA reaksiyonu hazırlandı. Hazırlanan karışım 69 örnek +1 pozitif kontrol içindi. Ölü hacimler dahil edilmedi. cDNA reaksiyonun hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. cDNA Reaksiyonu için gerekli karışım ve miktarları

İçerik	Miktar
5x miScript Hispec buffer	112 µL
10x miScript Nucleics mix	56 µL
DNase-RNase free su	56 µL
miScript Rev. Transcriptase mix	56 µL
Toplam	280 µL

- Tablo 3.1'de belirtilen karışım 8'li strip tüpün 6 kuyusuna 46 µL hacimde dağıtıldı.
- Piko plate içerisine izole edilen RNA örnekleri 3.5 µL dağıtıldı ve örnek dağıtılan kuyular kontrol edildi.
- Hazırlanan cDNA karışımı 3.5 µL olarak olarak RNA örnekleri üzerine dağıtıldı ve karışım dağıtılan kuyular kontrol edildi.
- Piko plate, plate karıştırıcıda 2000 rpm'de 3 dk karıştırıldı. Sonra, vorteks üzerinde 2 saniye karıştırıldı, 4-5 saniye kadar beklenmiş ve bir kez daha karıştırıldı. Daha sonra, plate santrifüjünde 60 saniye santrifüj edildi.

- Plate Thermal cycler'a alınmış ve Tablo 3.2'deki thermal programa göre cihaz başlatıldı.

Tablo 3.2. Thermal cycler'a ait program

Sıcaklık	Süre
37 °C	60 dk.
95 °C	5 dk.
4 °C	∞

- Thermal program sonunda plate, plate karıştırıcıda 60 saniye santrifüj edildi.
- Protokol sonunda cDNA örnekleri 1/5 oranında nükleaz free su ile dilüe edildi.

3.4.4. Primer seçimi

Çalışma kapsamında izolasyon aşamasında (internal kontrol) cel-miR-39, transkripsiyon kontrolü aşamasında miRTC ve araştırma kapsamındaki genler (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-181a-5p ve hsa-miR-320a) ile ilgili primerler seçildi. miRNA primerleri qiagen firmasından temin edilmiş olup kullanılan primer dizilerinin katalog numaraları aşağıda Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.3. Kullanılan primerler ve katalog numaraları

Primer	Katalog no
Cel-miR-39	MS00080247
miRTC	218161
hsa-miR-21-5P	MS00009079
hsa-miR-199a-5p	MS00006741
hsa-miR-199b-5p	MS00006741

3.4.5. Preamplifikasyon reaksiyonunun hazırlanması

Bu aşamada Qiagen miScript Microfluidics PreAMP kiti ve Qiagen miScript Primer Assay kullanıldı. Bu aşama Fluidigm Biomark Sistem ile kullanılmak üzere özel olarak tasarlanmıştır. Kit, Fluidigm Biomark Sistem'de miRNA kantifikasyonunu sağlamak ve ön amplifikasyon gerçekleştirmek için kullanılmaktadır. Bu aşama Fluidigm BioMark System üzerinde doğru ve kapsamlı miRNA ifade analizi yapmayı sağlayan bir ön çalışmadır. Bu aşamada RNA analizinde kullanılan Cel-miR-39'a ek olarak kontrol miRTC primeri kullanılmaktadır. Çalışma protokolü aşağıdaki gibidir:

- Tüpte gelen primerler (Qiagen, miScript Primer Assay, Cat.No: 331221) aşağıdaki gibi sulandırılarak 100 μ M konsantrasyona getirildi.
 - ✓ Primer tüpü 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
 - ✓ Tüp 27.5 μ L nuclease free su pipetlendi.
 - ✓ Tüp kısa aralıklarla bir süre vortekslendi.
 - ✓ Spin down yapıldı.
- PreAmp Primer Pool hazırlanması:
 - ✓ Çalışmada kullanılacak primerler ile Ctrl_miRTC ve Cel-miR-39 toplamda 7 primer ile çalışıldı.
 - ✓ Her primerden bir tüpe 1 μ L alınmış ve bu durumda toplam hacim 7 μ L oldu.
 - ✓ Primerler 500 kat sulandırılmış, bu durumda toplam hacim 500 μ L'ye tamamlandı.
 - ✓ Tüp vorteksle iyice karıştırılmış ve preamp primer pool olarak preamp mixe eklendi.

Tablo 3.4'de miktarları belirtilen karışım 69 örnek+1 pozitif kontrol için hazırlanmış ve ölü hacimler dahil edilmedi.

Tablo 3.4. Preamplifikasyon reaksiyonunu oluşturan maddeler ve miktarları

İçerik	Miktar
5x miScript Preamp buffer	160 µL
Hot start tag DNA poly (5U/µl)	25.6 µL
Preamp primer pool	160 µL
Dnase-RNAase free su	262.4 µL
miScript Preamp Univ. Pirmer	32 µL
Toplam	640 µL

- Karışım 8'li strip tüpün 6 kuyusuna 106 µL olacak şekilde dağıtıldı.
- Piko plate sulandırılan cDNA örneklerinden 2 µL dağıtılmış ve örnek dağıtılan kuyular kontrol edildi.
- cDNA'lar üzerine hazırlanan preamp karışımı 8 µL olarak dağıtılmış ve Mix dağıtılan kuyular kontrol edildi.
- Piko plate, plate karıştırıcı da 2000 rpm'de 3 dk karıştırıldı. Vorteks üzerinde 2 sn karıştırıldı, 4-5 saniye beklendi ve bir kez daha karıştırıldı. Plate santrifüjünde 60 sn santrifüj edildikten sonra aşağıdaki thermal programa alındı.

Tablo 3.5. cDNA reaksiyonunun gerçekleştirilmesine ait program

Sıcaklık	Süre	
95 °C	15 dk	
94 °C	30 sn	} 12 döngü
60 °C	3 dk	
4 °C	∞	

- Thermal program sonunda plate, plate karıştırıcıda 60 saniye santrifüj edildi.
- Daha sonra plate içerisine miScript Microfluidics PreAMP Kiti içerisinde bulunan Side reaction reducer 1 µL eklendi.
- Piko plate, plate karıştırıcı da 2000 rpm'de 3 dk karıştırıldı. Vorteks üzerinde 2 sn karıştırıldıktan sonra 4-5 sn bekletilip ve bir kez daha karıştırıldı. Plate santrifüjünde 60 sn santrifüj edildi ve aşağıdaki thermal programa alındı.

Tablo 3.6. Thermal program

Sıcaklık	Süre
37 °C	15 dk
95 °C	5 dk
4 °C	∞

- Thermal program sonunda plate, plate karıştırıcıda 60 saniye santrifüj edilmiştir.
- Protokol sonunda preamplifikasyon örnekleri nükleaz free su ile 1/5 oranında dilüe edildi.

3.4.6. Dynamic array hazırlanması

Dynamic Array hazırlanması aşamasında 6 ayrı adım vardır;

- ✓ Dynamic Array'ın PRIME edilmesi,
- ✓ Assay Plate'in hazırlanması,
- ✓ Örneklerin hazırlanması,
- ✓ Dynamic Array'e pipetlemelerin yapılması,
- ✓ IFC Controller da Dynamic Array'in Load edilmesi,
- ✓ Dynamic Array'in Biomark'ta çalışılması

3.4.6.1. Dynamic array'in prime edilmesi

Bir adet Dynamic Array'e kontrol sıvıları enjekte edildi ve Dynamic Array IFC Controller'da PRIME edildi. Bu işlem tam 20 dakika sürmüş ve PRIME işlemi devam ederken aşağıdaki aşamaya geçildi.

3.4.6.2. Assay plate'in hazırlanması

100 µM konsantrasyonda primerler, aşağıdaki gibi hazırlanarak Biomark'a yüklemeye hazır hale getirildi.

Tablo 3.7. Assay plate'i oluşturan maddeler ve miktarları

İçerik	Miktar
100 μ M primer	2.5 μ L
nuclease free su	3.75 μ L
microfluidic universal primer	6.25 μ L
2x Assay Loading Reagent	12.50 μ L
Toplam	25 μL

- Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 88 μ L olarak transfer edildi.
- Assay plate paketinden çıkarılmış ve bir plate taşıyıcı üzerine konuldu.
- 8 li strip tüpden 6 μ L alınarak Assay Plate'in tüm kuyularına pipetlendi.
- Assay Plate film ile kaplandı. Plate karıştırıcıda 2000 rpm'de 3 dakika karıştırıldı.
- Plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edildi.
- Hazırlanan bu karışım Dynamic Array'lere pipetlemeye hazır hale geldi.

3.4.6.3. Örneklerin hazırlanması

RT-PCR karışımı Tablo 3.7'de verilen hacimler 69 örnek +1 pozitif kontrol için hazırlandı (ölü hacimler dahil edilmedi).

Tablo 3.8. RT-PCR karışımı ve miktarları

İçerik	Miktar
qPCR Master Mix	255 μ L
20x DNA Binding Dye	25.5 μ L
Nuclease free su	59.5 μ L
Toplam	340 μL

- Karışım 8'li strip tüpün ilk 6 kuyusuna 56 μ L dağıtıldı.
- Temiz bir piko plate alınarak, preamplifiye örneklerden 2 μ L dağıtıldı. Örnek dağıtılan kuyular kontrol edildi.

- Örnekler üzerine 4 µL hazırlanan PCR karışımı dağıtıldı. Karışımın dağıtıldığı kuyular kontrol edildi.
- Piko plate, plate karıştırıcı da 2000 rpm'de 3 dakika karıştırıldı. Vorteks üzerinde 2 saniye karıştırıldıktan sonra 4-5 saniye beklendi ve bir kez daha karıştırıldı. Daha sonra, plate santrifüjünde 60 saniye santrifüj edildi.

3.4.6.4. Dynamic array'e pipetlemelerin yapılması

- Assay pipetlemeleri Viaflo Voyager (12.5 µL) kullanılarak yapıldı.
- Hazırlanan primer ve PCR karışımı Flexsix chip kuyularına 3.5 µL olarak pipetlendi.

3.4.6.5. IFC controller'da dynamic array'in load edilmesi

- Dynamic Array IFC Controller'a yerleştirildi ve LOAD Seçeneği seçilerek LOAD işlemi başlatıldı.
- Bu işlemi başlattıktan sonra BioMark Data Collection yazılımı başlatıldı ve "Double Click to Turn Lamp On" kısmına çift tıklanarak BioMark'ın lambası çalıştırıldı. Lambanın ısınması 20 dakika sürdü.

3.4.6.6. Dynamic array'in biomark'ta çalışılması

- Dynamic Array IFC Controller'den alındı. Dynamic Array altındaki mavi filmin uzaklaştırıldığından emin olundu. Chip yüzeyinin temiz olup olmadığı kontrol edildi. Dynamic Array BioMark'a barcode kısmı dışarı bakacak şekilde yerleştirildi.
- BioMark Data Collection yazılımı yardımı ile Dynamic Array çalıştırıldı. Verilerin kaydedileceği yer ve Dosya adı seçildikten sonra diğer sayfada "Gene Expression" seçildi. Passive Reference Dye olarak "ROX" seçildi. "Probe Type" kısmında "SybrGreen" seçildi.
- Sonraki ekranda Protokoller arasından "Exiqon miRNA Protokol" seçildi ve Program başlatıldı.

MikroRNA'ların analiz edilmesinde kullanılacak olan RT-PCR koşulları kısaca Tablo 3.9'de gösterilmiştir.

Tablo 3.9. MikroRNA'ların analiz edilmesinde kullanılacak olan RT-PCR koşulları

	Sıcaklık/Süre	
	50 °C, 120 sn	
Termal Karışım	70 °C, 1800 sn	
	25 °C, 600 sn	
Başlama Sıcaklığı	95 °C, 600 sn	
Denatürasyon	94 °C, 15 sn	
Bağlanma	55 °C, 30 sn	30 Döngü
Uzama	70 °C, 30 sn	
Erime Sıcaklığı	60-95 °C	

3.5. İstatistiksel Analiz

Hasta ve kontrol grubundaki sayısal verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro wilk testi ile test edilmiştir. Normal dağılıma uyan değişkenlerin iki grupta karşılaştırılmasında Student t testi, normal dağılmayan değişkenlerin iki grupta karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrasındaki miRNA ekspresyon düzeylerinin ölçümlerinin karşılaştırılması için normal dağılan değişkenlerde tekrarlanan ölçümlü varyans analizi ve LSD çoklu karşılaştırma testleri, normal dağılmayan değişkenlerde Friedman 2 yönlü varyans analizi ve all pairwise çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. MikroRNA'ların ekspresyon düzeyleri ile kardiyak belirteçler arasındaki ilişkiler spearman korelasyon katsayısı ile test edilmiştir. Operasyon öncesi miRNA ekspresyon düzeylerinin değişkenleri için yapılan ROC analizi sonucunda cut off değerleri belirlenmiştir. Analizlerde SPSS 22.0 paket programı kullanılmıştır. $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

3.5.1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time-PCR) gen ifadesinin hesaplanması

Real-time PCR'daki reaksiyonlar döngü sayısı ve her bir döngü esnasında gerçekleşen floresan ışımaya ile gerçekleşmektedir. Her bir döngü Ct (cycle threshold) olarak adlandırılmaktadır. Real-time PCR'da gen miktarı çok olan ilk reaksiyona giren gen

olmaktadır. Dolayısıyla erken Ct değerlerinde reaksiyona giren gen miktar olarak en çok bulunan gen olmaktadır. Real-time PCR’da çalışmaları standart hale getirmek ve pipet hatalarını gidermek amacıyla housekeeping genler veya referans genler (endojen kontrol) kullanılır. Plate içerisinde hedef gen ve referans genler primerleriyle reaksiyona girerek belirli bir Ct değerinde floresan ışıma verirler. Dolayısıyla çalışmadaki gen miktarını normalize etmek amacıyla hedef genden referans yada housekeeping genin Ct değerleri çıkartılır. Elde edilen değere delta Ct (ΔCt) değeri adı verilir. Çalışma, tedavi öncesi ve sonrası veya hasta grubu ve sağlıklı grup ise her iki grubun ΔCt değerleri birbirlerinden çıkartılır. Elde edilen değere delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) değeri adı verilir. Gen ifadesinde hasta ve kontrol gruplarına ait ΔCt değerleri tek başına genin downregüle yada upregüle olduğunu anlamamızda yeterli olurken hasta ve kontrol grubu arasındaki gen ifadesinin kat değişiminin (fold change) hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesabından yararlanılır.

Delta Ct = Ct hedef gen – Ct endojen kontrol

Delta Delta Ct = ΔCt hasta – ΔCt sağlıklı

Delta Delta Ct = ΔCt hasta (Ct hedef gen – Ct endojen kontrol) – ΔCt sağlıklı (Ct hedef gen – Ct endojen kontrol)

FC= Fold Change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

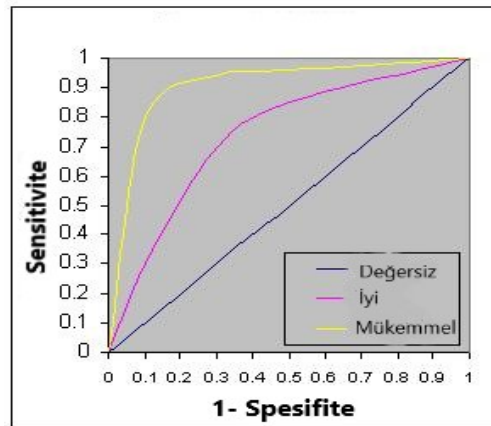
Çalışmamızda endojen kontrol geni olarak cel-miR-39 kullanıldı. Koroner arter hastaları (Pre-Op, Saat1 ve Saat24) ve sağlıklı gönüllülerdeki miRNA’lara ait ΔCt değerleri istatistiksel olarak hesaplandı ve ortalamaları alındı. Daha sonra $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesabına göre hasta grupları (Pre-Op, Saat1 ve Saat24), hasta ve sağlıklı gruplar arasındaki kat değişimleri hesaplandı.

3.5.2. ROC analizi

ROC analizi II. Dünya Savaşı sırasında Britanya’da radarda tespit edilen sinyallerin doğru tanımlanması, dost ve düşman ayrımının sağlanması için geliştirilmiştir. 1967 yılında Lusted, ROC analizinin tıpta karar vermede kullanımını önererek, 1969 yılında medikal görüntüleme cihazlarında kullanımını sağlamıştır. Sonraki yıllarda tıpta tanı testlerinin performansının değerlendirilmesinde kullanımı ile giderek yaygınlaşmıştır. ROC analizi ile ortaya çıkan gelişmeler, istatistiksel sonuçların değerlendirilmesi ve kıyaslanmasına duyulan gereksinimin doğal bir sonucu olmaktadır.

ROC eğrisi, duyarlılık ve seçicilik arasındaki ilişkinin grafiksel bir gösterimi olmaktadır. Eğriler yardımı ile bir tanı testi için en iyi eşik değeri saptanarak en uygun modele karar verilebilmektedir. Ayrıca farklı tanı testlerinin doğru klinik tanı koymadaki başarısının karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır. ROC analizi; tanı sürecinin uzun zaman alacağı, maliyetin yüksek, özel yöntem-ekipman ve nitelikli insan gücüne gereksinim duyulacağı durumlarda; kısa zamanda, düşük maliyetle, kolay elde edilebilen belirteçler için uygun kesim noktalarını belirleyerek klinik karar verme sürecine önemli katkı sağlayacak bir analiz yöntemi olmaktadır. ROC eğrisinin altında kalan alan, testin hastalar ile hasta olmayan bireyleri ayırmadaki doğruluk oranını belirlemektedir. ROC eğrisinin altında kalan alanın büyüklüğü üzerinde çalışılan tanı testinin ayırma yeteneğinin istatistiksel olarak önemini göstermektedir. Üzerinde çalışılan tanı testinin hiç ayırma yeteneği olmadığı durumda ROC eğrisi altındaki alanın beklenen değeri 0.50'dir. Mükemmel bir test ise sıfır yanlış pozitif ve sıfır yanlış negatif ile alanın değeri 1.00 olacaktır. Test, bu iki değerin arasında bir alana sahip olmalıdır (188). Eğri altındaki alanların yorumlanmasında aşağıda verilen derecelendirmeler kullanılmaktadır:

- .90-1.00 = mükemmel
- .80- .90 = iyi
- .70 - .80 = orta
- .60- .70 = zayıf
- .50- .60 = başarısız



Şekil 3.1. ROC Eğrisi

4. BULGULAR

Çalışma kapsamında, Sanko Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda kardiyopulmoner bypass yapılması için gereken klinik özelliklere sahip 46 hastadan operasyon öncesi ve operasyondan 1 ve 24 saat sonra olmak üzere periferik kan örnekleri alındı. Aynı klinikte hasta yakını olan, koroner arter hastalığı ve ilgili miRNA'ları etkileyebilecek rahatsızlığı olmayan 48 gönüllünün de periferik kanları toplandı. Toplam 94 periferik kan örneğinin serumlarında incelemeler yapıldı.

4.1. Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Demografik ve Klinik Bulgular

Hasta ve kontrol grubuna ait elde edilen demografik ve klinik bulgular Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait demografik ve klinik veriler

Demografik ve Klinik Özellikler	Hasta Grubu (E=20, K=26) ORT±STD	Kontrol Grubu (E=16, K=32) ORT±STD	Karşılaştırmalar
Yaş	62.630 ± 11.249	42.340 ± 11.249	p=0.001
LDH	228.159 ± 65.975	192.438 ± 23.828	p=0.001
BUN	18.620 ± 8.684	13.790 ± 9.908	p=0.001
Glukoz	100.304 ± 8.684	94.708 ± 9.908	p=0.002

Hasta ve kontrol grubu demografik özellikler açısından karşılaştırıldığında yaş, LDH, kan üre azotu değeri (BUN) ($p<0.001$) ve glukoz ($p<0.002$) değerleri arasında anlamlı farklılıklar bulundu.

4.2. Hasta Grubunun Operasyon Verilerine Ait Bulgular

Hasta grubunun operasyon verilerine ait bulgular Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Hasta grubunun operasyonuna ait veriler

Yoğun Bakım (saat)	49.956 ± 8.817
Postop Hastanede Kalma Süresi (gün)	5.544 ± 0.836
Ağırlık (kg)	80.348 ± 7.218
Kardiyopulmoner Bypass Süresi (dakika)	54.174 ± 9.481
Kross Klamp Süresi (dakika)	37.696 ± 7.387
Bypass Sayısı	3.304 ± 0.866

4.3. Hasta Grubu ile Kontrol Grubuna Ait Tanısal Değerler

Operasyon öncesi hasta ve kontrol grubuna ait miRNA ve kardiyak belirteç değerlerine ait bulgular Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Operasyon öncesi hasta grubu ve kontrol grubuna ait miRNA Δ Ct değerlerinin karşılaştırılması

	Grup	N	Ortalama Δ Ct	Std.Sapma	P
miR-21-5p	Kontrol	48	2.393	1.353	0.001*
	Hasta	46	3.732	2.389	
miR-181a-5p	Kontrol	48	9.061	2.245	0.001*
	Hasta	46	11.580	3.533	
miR-199a-5p	Kontrol	48	7.639	2.499	0.001*
	Hasta	46	10.994	3.725	
miR-199b-5p	Kontrol	48	8.246	1.570	0.001*
	Hasta	46	10.560	3.496	
miR-320a	Kontrol	48	2.016	1.587	0.004*
	Hasta	46	3.555	3.113	

Tablo 4.4. Operasyon öncesi hasta ve kontrol grubuna ait kardiyak belirteç değerleri

	Grup	N	Ortalama	Std. Sapma	P
Troponin I	Kontrol	48	0.021	0.144	0.001*
	Hasta	46	0.862	2.800	
CPK	Kontrol	48	79.125	40.256	0.812
	Hasta	46	87.976	57.070	
CK-MB	Kontrol	48	18.102	4.738	0.001*
	Hasta	46	27.902	17.597	

Operasyon öncesi hasta grubu ile kontrol grubunun miRNA değerleri arasında anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.001$). Operasyon öncesi hasta grubu ile kontrol grubunun kardiyak troponin, kreatinin fosfokinaz (CPK) ve kreatinin kinaz-MB (CK-MB) değerleri karşılaştırıldı ve CK-MB ile kardiyak troponin değerleri açısından anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.001$).

4.3.1. Hasta grubundaki miR-21'e ait bulgular

Hasta grubundaki operasyon öncesi, operasyondan 1 saat ve 24 saat sonra miR-21'e ait ortalama Δ CT ve standart sapma değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. Hasta grubundaki miR-21'e ait ortalama Δ CT ve standart sapma değerleri

	N	Ortalama Δ CT	Std.Sapma	P
Preop-miR21	46	3.732	2.390	0.001*
Saat-1-miR21	46	3.850	2.662	0.001*
Saat-24-miR21	46	3.860	2.272	0.001*

Student-T testi kontrol ; pre-op, saat1 ve saat24 $p<0.05$, *

Hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrasındaki miR-21 değişimleri arasında anlamlı farklılıklar bulunamadı.

Tablo 4.6. Hasta grubundaki miR-21'e ait değişimlerin karşılaştırılması

	P
Preop-miR21 ; Saat-1-miR21	0.798
Preop-miR21 ; Saat-24-miR21	0.737
Saat-1-miR21 ; Saat-24-miR21	0.978
Normal dağılım, paired T testi; p<0.05	

4.3.2. Hasta grubundaki miR-181a'ya ait bulgular

Hasta grubundaki operasyon öncesi, operasyondan 1 saat ve 24 saat sonra miR-181a'ya ait ortalama Δ CT ve standart sapma değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Hasta grubundaki miR-181a'ya ait ortalama Δ CT ve standart sapma değerleri

	N	Ortalama ΔCT	Std.Sapma	P
Preop-miR181a	46	11.580	3.530	0.001*
Saat-1-miR181a	46	10.390	3.580	0.001*
Saat-24-miR181a	46	10.680	3.410	0.005*
Mann-whitney testi, kontrol ; pre-op, saat1 ve saat24 p<0.05				

Hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrasındaki miR-181a değişimleri arasında anlamlı farklılıklar bulunamadı.

Tablo 4.8. Hasta grubundaki miR-181a'ya ait değişimlerin karşılaştırılması

	P
Preop-miR181a ; Saat-1-miR181a	0.079
Preop-miR181a ; Saat-24-miR181a	0.183
Saat-1-miR181a ; Saat-24-miR181a	0.634
Normal dağılım, paired T testi; p<0.05	

4.3.3. Hasta grubundaki miR-199a'ya ait bulgular

Hasta grubundaki operasyon öncesi, operasyondan 1 saat ve 24 saat sonra miR-199a'ya ait ortalama Δ CT ve standart sapma değerleri Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Hasta grubundaki miR-199a'ya ait ortalama Δ CT ve standart sapma değerleri

	N	Ortalama Δ CT	Std.Sapma	P
Preop-miR199a	46	10.994	3.724	0.001
Saat-1-miR199a	46	10.480	3.778	0.001
Saat-24-miR199a	46	11.727	3.424	0.001

Mann-whitney testi, kontrol ; pre-op, saat1 ve saat24 p<0.05

Tablo 4.10. Hasta grubundaki miR-199a'ya ait değişimlerin karşılaştırılması

	P
Preop-miR199a ; Saat-1-miR199a	0.452
Preop-miR199a ; Saat-24-miR199a	0.251
Saat-1-miR199a ; Saat-24-miR199a	0.044

Normal dağılım, paired T testi; p<0.05

Hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrasındaki miR-199a değişimleri değerlendirildiğinde sadece 1. Saat ve 24. Saat arasında anlamlı farklılıklar bulundu (p=0.044).

4.3.4. Hasta grubundaki miR-199b'ye ait bulgular

Hasta grubundaki operasyon öncesi, operasyondan 1 saat ve 24 saat sonra miR-199b'ye ait ortalama Δ CT ve standart sapma değerleri Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11. Hasta grubundaki miR-199b'ye ait ortalama Δ CT ve std. sapma değerleri

	N	Ortalama Δ CT	Std.Sapma	P
Preop-miR199b	46	10.560	3.500	0.001
Saat-1-miR199b	46	10.285	3.310	0.001
Saat-24-miR199b	46	10.810	3.170	0.001

Student-T testi kontrol ; pre-op, saat1 ve saat24 p<0.05

Hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrasındaki miR-199b değişimleri arasında anlamlı farklılıklar bulunamadı.

Tablo 4.12. Hasta grubundaki miR-199b'ye ait değişimlerin karşılaştırılması

	P
Preop-miR199b ; Saat-1-miR199b	0.980
Preop-miR199b ; Saat-24-miR199b	0.300
Saat-1-miR199b ; Saat-24-miR199b	0.300

Normal dağılım, paired T testi; p<0.05

4.3.5. Hasta grubundaki miR-320a'ya ait bulgular

Hasta grubundaki operasyon öncesi, operasyondan 1 saat ve 24 saat sonra miR-320a'ya ait ortalama Δ CT ve standart sapma değerleri Tablo 4.13'de verilmiştir.

Tablo 4.13. Hasta grubundaki miR-320a'ya ait ortalama Δ CT ve std. sapma değerleri

	N	Ortalama Δ CT	Std.Sapma	P
Preop-miR320a	46	3.555	3.113	0.004
Saat-1-miR320a	46	3.901	3.606	0.002
Saat-24-miR320a	46	3.618	3.190	0.004

Mann-whitney testi kontrol ; pre-op, saat1 ve saat24 p<0.05

Hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrasındaki miR-320a değişimleri arasında anlamlı farklılıklar bulunamadı.

Tablo 4.14. Hasta grubundaki miR-320a'ya ait değişimlerin karşılaştırılması

	P
Preop-miR320a ; Saat-1-miR320a	0.567
Preop-miR320a ; Saat-24-miR320a	0.908
Saat-1-miR320a ; Saat-24-miR320a	0.521

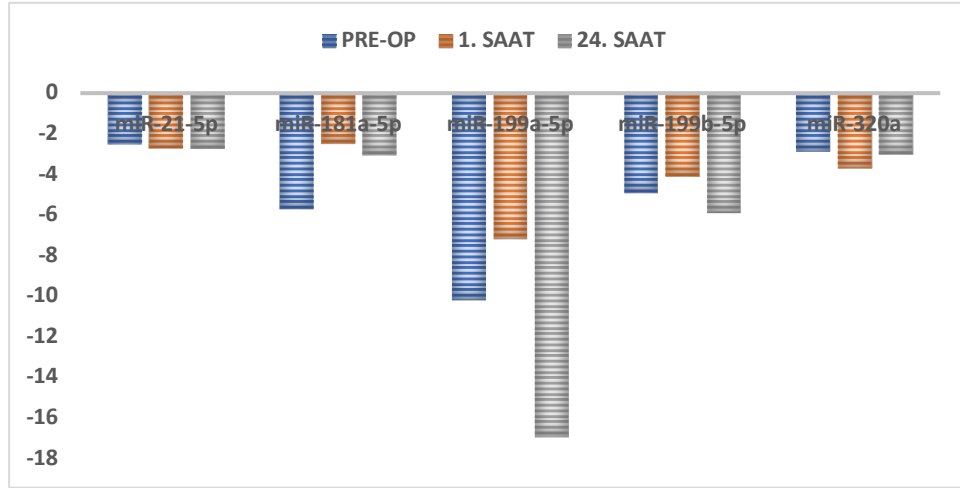
Normal dağılım, paired T testi; p<0,05

4.3.6. Hasta ve kontrol grubundaki miRNA'lara ait kat değişim bulguları

Hasta grubundaki miRNA'lara ait kat değişim değerlerinin ($2^{-\Delta\Delta CT}$) kontrol grubuna göre karşılaştırılması Tablo 4.15 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.15. Hasta grubundaki miRNA değerlerinin kontrol grubuna göre kat değişimleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

	Preop	1. saat	24. saat
hsa-miR-21-5p	-2.53	-2.74	-2.76
hsa-miR-181a-5p	-5.71	-2.50	-3.06
hsa-miR-199a-5p	-10.20	-7.19	-16.95
hsa-miR-199b-5p	-4.95	-4.11	-5.91
hsa-miR-320a	-2.90	-3.69	-3.03

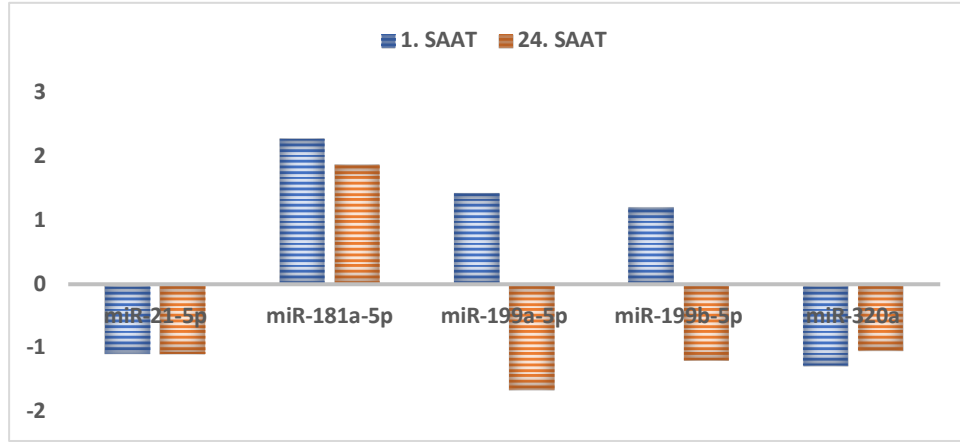


Şekil 4.1. Hasta grubundaki miRNA kat değişimleri

Hasta grubundaki operasyon öncesi ve sonrası miRNA'lara ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ 'lerin karşılaştırılması Tablo 4.16 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.16. Operasyon öncesi miRNA değerlerine göre operasyon sonrası miRNA değerlerinin kat değişimleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

	1. saat	24. saat
hsa-miR-21-5p	-1.08	-1.09
hsa-miR-181a-5p	2.281	1.867
hsa-miR-199a-5p	1.428	-1.66
hsa-miR-199b-5p	1.206	-1.19
hsa-miR-320a	-1.27	-1.04



Şekil 4.2. Hasta grubundaki 1. ve 24. saatlerdeki miRNA kat değişimleri

4.4. Hasta Grubuna Ait Kardiyak Belirteçlere Ait Bulgular

4.4.1. Troponin

Hasta grubundaki troponin değerlerine ait operasyon öncesi ve sonrası ortalama ve std. sapma değerleri Tablo 4.17’de, operasyon öncesi ve sonrası troponin verilerindeki değişimler Tablo 4.18’de gösterilmiştir.

Tablo 4.17. Hasta grubundaki troponin değerlerinin ortalama ve std. sapma değerleri

	N	Ortalama	Std.Sapma	P
Preop-Troponin	46	0.862	2.800	0.001
Saat-1-Troponin	46	14.544	69.035	
Saat-24-Troponin	46	4.573	7.735	

Tablo 4.18. Hasta grubunda troponin verilerindeki değişimlerin karşılaştırılması

	P
Preop-Troponin ; Saat-24-Troponin	0.001
Preop-Troponin ; Saat-1-Troponin	0.001
Saat-24-Troponin ; Saat-1-Troponin	0.348

Hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrası troponin değerleri değerlendirildiğinde operasyon öncesi ile operasyondan 1 saat ve 24 saat sonraki değerler arasında anlamlı farklılıklar görüldü.

4.4.2. Ejeksiyon fraksiyonu

Hasta grubundaki ejeksiyon fraksiyonu (EF) değerlerine ait operasyon öncesi ve sonrası ortalama ve std. sapma değerleri Tablo 4.19’da, operasyon öncesi ve sonrası ejeksiyon fraksiyonu verilerindeki değişimler Tablo 4.20’de gösterilmiştir.

Tablo 4.19. Hasta grubundaki ejeksiyon fraksiyonu değerlerinin ortalama ve std. sapma değerleri

	N	Ortalama	Std.Sapma	P
Preop-EF	46	55.630	9.509	0.056
Saat-1-EF	46	56.283	8.961	
Saat-24-EF	46	56.370	9.034	

Tablo 4.20. Hasta grubunda ejeksiyon fraksiyonu verilerindeki değişimlerin karşılaştırılması

	P
Preop-EF ; Saat-24-EF	0.041
Preop-EF ; Saat-1-EF	0.062
Saat-24-EF ; Saat-1-EF	0.477

Hasta grubunda sadece operasyon öncesi ve 24. Saat sonrasındaki ejeksiyon fraksiyonu değişimleri arasında anlamlı farklılık mevcuttur.

4.4.3. Kreatinin fosfokinaz

Hasta grubundaki kreatinin fosfokinaz (CPK) değerlerine ait operasyon öncesi ve sonrası ortalama ve std. sapma değerleri Tablo 4.21’de, operasyon öncesi ve sonrası kreatinin fosfokinaz verilerindeki değişimler Tablo 4.22’de gösterilmiştir.

Tablo 4.21. Hasta grubundaki kreatinin fosfokinaz değerlerinin ortalama ve std. sapma değerleri

	N	Ortalama	Std.Sapma	P
Preop-CPK	46	87.976	57.070	0.001
Saat-1-CPK	46	429.130	335.212	
Saat-24-CPK	46	451.109	253.716	

Tablo 4.22. Hasta grubunda kreatinin fosfokinaz verilerindeki değişimlerin karşılaştırılması

	P
Preop-CPK ; Saat-24-CPK	0.001
Preop-CPK ; Saat-1-CPK	0.001
Saat-24-CPK ; Saat-1-CPK	0.835

Hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrası kreatinin fosfokinaz değerleri değerlendirildiğinde operasyon öncesi ile operasyondan 1 saat ve 24 saat sonraki değerler arasında anlamlı farklılıklar görüldü.

4.4.4. Kreatinin kinaz-mb

Hasta grubundaki kreatinin kinaz-MB (CK-MB) değerlerine ait operasyon öncesi ve sonrası ortalama ve std. sapma değerleri Tablo 4.23'te, operasyon öncesi ve sonrası kreatinin fosfokinaz verilerindeki değişimler Tablo 4.24'te gösterilmiştir.

Tablo 4.23. Hasta grubundaki kreatinin kinaz-MB değerlerinin ortalama ve std. sapma değerleri

	N	Ortalama	Std.Sapma	P
Preop-CK-MB	46	27.902	17.597	0.001
Saat-1-CK-MB	46	63.394	64.474	
Saat-24-CK-MB	46	55.491	52.029	

Tablo 4.24. Hasta grubunda kreatinin kinaz-MB verilerindeki değişimlerin karşılaştırılması

	P
Preop-CK-MB ; Saat-24-CK-MB	0.001
Preop-CK-MB; Saat-1-CK-MB	0.001
Saat-24-CK-MB ; Saat-1-CK-MB	0.002

Hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrasındaki kreatinin kinaz-MB değerleri değerlendirildiğinde operasyon öncesi ile operasyondan 1 saat ve 24 saat sonraki değerler ve operasyondan 1 saat ve 24 saat sonraki değerler arasında anlamlı farklılıklar görüldü.

4.5. Hasta Grubundaki Tanısal Değerlerin Birbiriyle Olan Korelasyonları

4.5.1. MikroRNA-21

Hasta grubundaki miR-21 ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlara ait bulgular Tablo 4.25'te gösterilmiştir.

Tablo 4.25. Hasta grubunda miR-21 ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlar

		Troponin			CK-MB		
		Preop	1. Saat	24. Saat	Preop	1. Saat	24. Saat
Preop miR21	r	0.344	0.072	0.062	0.252	0.008	-0.160
	p	0.019	0.636	0.681	0.091	0.956	0.288
	N	46	46	46	46	46	46
Saat-1- miR21	r	0.146	-0.181	-0.085	0.231	0.047	-0.265
	p	0.333	0.229	0.572	0.123	0.757	0.075
	N	46	46	46	46	46	46
Saat-24- miR21	r	0.106	-0.380	-0.082	0.095	0.080	0.032
	p	0.485	0.009	0.589	0.528	0.598	0.832
	N	46	46	46	46	46	46

r: korelasyon değeri, p: anlamlılık, N: kişi sayısı,

Hasta grubunda operasyon öncesi miR-21 ile operasyon öncesi kardiyak troponin değerleri arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki bulunmaktadır ($r=0.344$, $p=0.019$). Operasyondan 24. saatten sonraki miR-21 değerleri ile 1. Saatte ölçülen kardiyak troponin değerleri arasında negatif yönde zayıf bir ilişki bulunmaktadır ($r=-0.380$, $p=0.009$). Ancak miR-21 ile CK-MB değerleri arasında herhangi bir korelasyon bulunamadı.

4.5.2. MikroRNA-181a

Hasta grubundaki miR-181a ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlara ait bulgular Tablo 4.26'da gösterilmiştir.

Tablo 4.26. Hasta grubunda miR-181a ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlar

		Troponin			CK-MB		
		Preop	1. Saat	24. Saat	Preop	1. Saat	24. Saat
Preop miR181a	r	0.191	-0.054	0.062	0.056	0.002	-0.054
	p	0.203	0.720	0.680	0.713	0.991	0.722
	N	46	46	46	46	46	46
Saat-1-miR181a	r	0.143	-0.331	0.013	0.306	0.321	0.075
	p	0.342	0.025	0.934	0.039	0.030	0.623
	N	46	46	46	46	46	46
Saat-24-miR181a	r	-0.015	-0.361	-0.059	0.011	0.180	-0.061
	p	0.921	0.014	0.696	0.944	0.232	0.688
	N	46	46	46	46	46	46

r: korelasyon değeri, p: anlamlılık, N: kişi sayısı,

Hasta grubunda operasyondan 1 saat sonra ölçülen miR-181a değerleri ile 1 saat ve 24 saat sonra ölçülen kardiyak troponin değerleri arasında negatif yönde zayıf bir ilişki ($r=-0.331$, $p=0.025$ - $r=-0.361$, $p=0.014$) bulunmaktadır. Operasyondan 1 saat sonra ölçülen miR-181a değerleri ile operasyon öncesi ve 1 saat sonrası CK-MB değerleri arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki bulundu ($r=0.306$, $p=0.039$ – $r=0.321$, $p=0.030$).

4.5.3. MikroRNA-199a

Hasta grubundaki miR-199a ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlara ait bulgular Tablo 4.27’de gösterilmiştir.

Tablo 4.27. Hasta grubunda miR-199a ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlar

		Troponin			CK-MB		
		Preop	1. Saat	24. Saat	Preop	1. Saat	24. Saat
Preop miR199a	r	0.214	0.073	0.125	-0.051	0.037	-0.133
	p	0.153	0.628	0.409	0.736	0.807	0.377
	N	46	46	46	46	46	46
Saat-1- miR199a	r	0.118	0.077	-0.035	-0.026	0.202	-0.037
	p	0.436	0.611	0.819	0.866	0.178	0.806
	N	46	46	46	46	46	46
Saat-24- miR199a	r	-0.099	-0.469	-0.214	-0.137	-0.050	-0.178
	p	0.14	0.001	0.153	0.364	0.742	0.236
	N	46	46	46	46	46	46

r: korelasyon değeri, p: anlamlılık, N: kişi sayısı,

Hasta grubunda operasyondan 24 saat sonraki miR-199a değerleri ile operasyondan 1 saat sonra ölçülen kardiyak troponin değerleri arasında negatif yönde orta şiddette bir ilişki bulunmaktadır ($r=-0.469$, $p=0.001$). miR-199a değerleri ile CK-MB değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır.

4.5.4. MikroRNA-199b

Hasta grubundaki miR-199b ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlara ait bulgular Tablo 4.28’de gösterilmiştir.

Tablo 4.28. Hasta grubunda miR-199b ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlar

		Troponin			CK-MB		
		Preop	1. Saat	24. Saat	Preop	1. Saat	24. Saat
Preop miR199b	r	0.135	0.016	0.049	-0.044	-0.059	-0.191
	p	0.372	0.917	0.747	0.769	0.699	0.203
	N	46	46	46	46	46	46
Saat-1- miR199b	r	0.235	0.003	0.085	0.014	0.225	-0.073
	p	0.116	0.987	0.574	0.924	0.132	0.632
	N	46	46	46	46	46	46
Saat-24- miR199b	r	0.044	-0.313	-0.066	-0.033	0.129	-0.026
	p	0.769	0.034	0.664	0.826	0.393	0.864
	N	46	46	46	46	46	46

r: korelasyon değeri, p: anlamlılık, N: kişi sayısı,

Hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrası miR-199b ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır.

4.5.5. MikroRNA-320a

Hasta grubundaki miR-320a ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlara ait bulgular Tablo 4.29’da gösterilmiştir.

Tablo 4.29. Hasta grubunda miR-320a ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlar

		Troponin			CK-MB		
		Preop	1. Saat	24. Saat	Preop	1. Saat	24. Saat
Preop miR320a	r	0.318	0.001	0.033	0.189	0.006	-0.155
	p	0.031	0.992	0.826	0.209	0.970	0.304
	N	46	46	46	46	46	46
Saat-1- miR320a	r	0.195	-0.244	-0.109	0.198	0.210	-0.084
	p	0.194	0.102	0.472	0.188	0.162	0.577
	N	46	46	46	46	46	46
Saat-24- miR320a	r	0.034	-0.215	0.016	-0.036	0.226	-0.029
	p	0.823	0.152	0.913	0.814	0.131	0.846
	N	46	46	46	46	46	46

r: korelasyon değeri, p: anlamlılık, N: kişi sayısı,

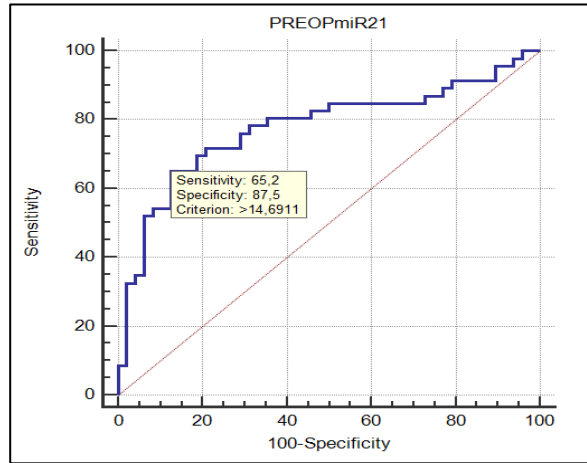
Hasta grubunda operasyon öncesi miR-320a ile operasyon öncesi kardiyak troponin değerleri arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki bulunmaktadır ($r=0.318$, $p=0.031$). Ancak miR-320a değerleri ile CK-MB değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır.

4.6. miRNA'ların Duyarlılık ve Özgünlük Analizi (ROC)

MiRNA'ların belirteç olarak değerlendirildiği çalışmalarda ROC (Recover Operation Curve) analizinden yararlanılmaktadır.

4.6.1. MikroRNA-21

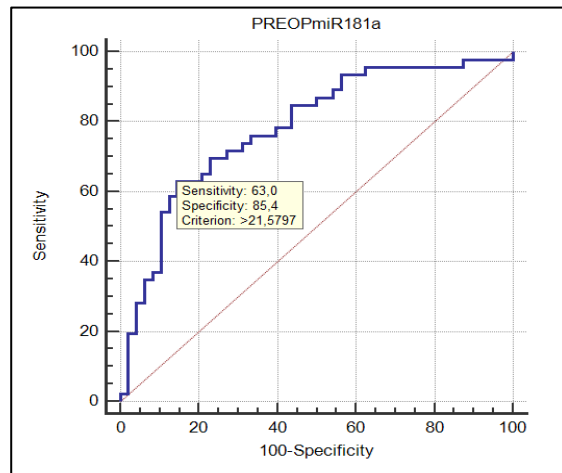
Operasyon öncesi miR-21 değerlerinin ROC analizi yapıldığında ROC eğrisi altındaki alan (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.680-0.857) 0.777 bulundu. Operasyon öncesi miR-21 değerlerinin duyarlılığı %65 ve özgüllüğü %87.50 bulundu. miR-21'e ait ROC değerleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. miR-21'e ait ROC değerleri

4.6.2. MikroRNA-181a

Operasyon öncesi miR-181a değerlerinin ROC analizi yapıldığında ROC eğrisi altındaki alan (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.687-0.862) 0.784 bulundu. Operasyon öncesi miR-181a değerlerinin duyarlılığı %63.04 ve özgüllüğü %85.42 bulundu. miR-181a'ya ait ROC değerleri Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

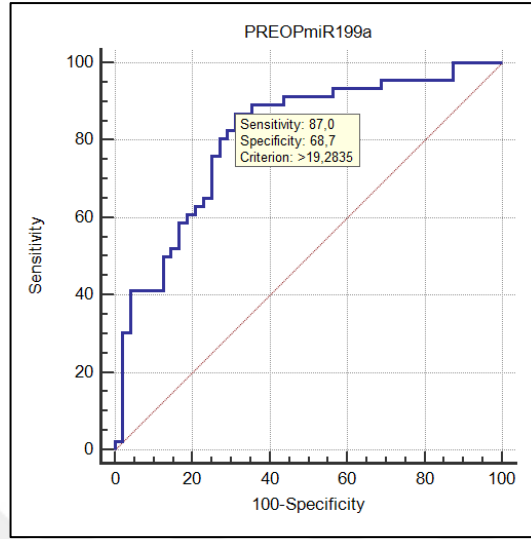


Şekil 4.4. miR-181a'ya ait ROC değerleri

4.6.3. MikroRNA-199a

Operasyon öncesi miR-199a değerlerinin ROC analizi yapıldığında ROC eğrisi altındaki alan (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.716-0.883) 0.810 bulundu. Operasyon öncesi

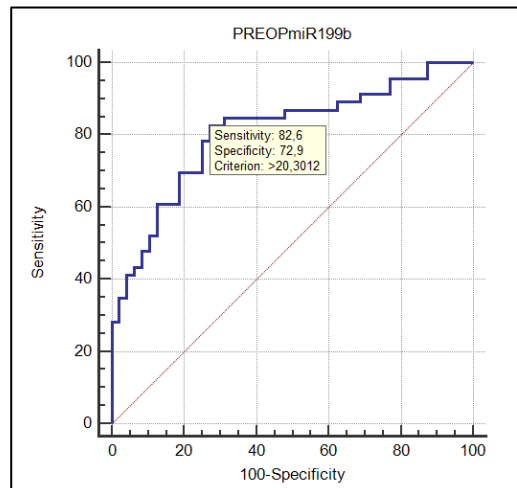
miR-199a değerlerinin duyarlılığı %86.96 ve özgüllüğü %68.75 bulundu. miR-199a'ya ait ROC değerleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. miR-199a'ya ait ROC değerleri

4.6.4. MikroRNA-199b

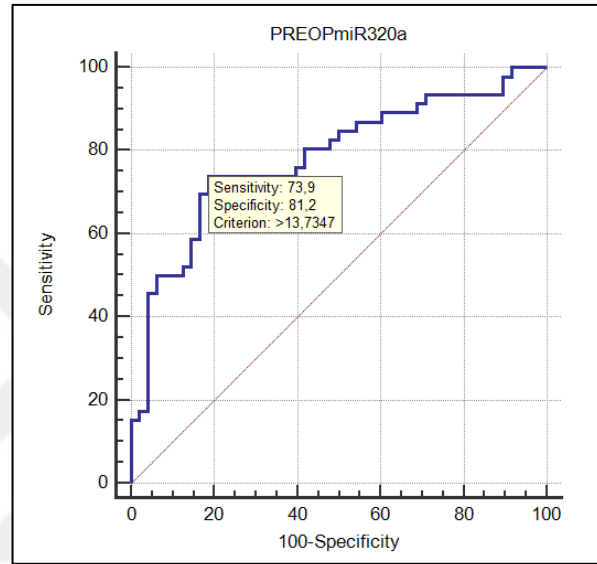
Operasyon öncesi miR-181a değerlerinin ROC analizi yapıldığında ROC eğrisi altındaki alan (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.714-0.882) 0.808 bulundu. Operasyon öncesi miR-199b değerlerinin duyarlılığı %82.61 ve özgüllüğü %72.92 bulundu. miR-199b'ye ait ROC değerleri Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. miR-199b'ye ait ROC değerleri

4.6.5. MikroRNA-320a

Operasyon öncesi miR-320a değerlerinin ROC analizi yapıldığında ROC eğrisi altındaki alan (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.688-0.863) 0.784 bulundu. Operasyon öncesi miR-320a değerlerinin duyarlılığı %73.91 ve özgüllüğü %81.25 bulundu. miR-320a'ya ait ROC değerleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. miR-320a'ya ait ROC değerleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Koroner kalp hastalığı (KKH), kardiyovasküler hastalıklar arasında en sık görülen olup gelişmiş ülkelerde başlıca ölüm nedenidir. Bu hastalığa bağlı ölümler, batı ülkelerinde son yıllarda yavaş yavaş azalmakla birlikte, hala 35 yaş üstündeki tüm ölümlerin yaklaşık 1/3' ün nedeni olmaya devam etmektedir (189).

Koroner arter hastalığı, genellikle ateroskleroz sonucu koroner arterlerin daralması veya tıkanması nedeniyle oluşmaktadır. Koroner damarlardaki akışın laminar olmayıp titreşimli olması, burada endotelial basınca neden olmaktadır. Damar duvarındaki basıncın değişmesine bağlı olarak geçirgenlik değişmekte ve damar duvarı tabakaları arasında lipid tabakası oluşmaktadır. Koroner damarların morfolojisi ile ilişkili olan bu durum koroner arter hastalığının gelişmesinde temel bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (190). Damar duvarını kapsayan tabakalar arasında lipid tabakasının oluşmasına ve kötüleşmesine neden olan başka durumlar da söz konusudur. Bunlar genel olarak koroner arter hastalığı risk faktörleri olan sigara, egzersiz yetersizliği, obezite, kolesterolden zengin diyet ve yüksek kan basıncıdır. Dolayısıyla koroner arter hastalığı, risk faktörleri azaltılarak yönetilebilecek ve kontrol altına alınabilecek bir hastalıktır (191). Ancak damar duvarında lipidlerin birikmesi, okside olması ve burada inflamatuvar yanıtların gelişmesine bağlı olarak plakların oluştuğu ve prognozun kötü seyrettiği durumlar da söz konusu olmaktadır (192, 193). Bu durumda koroner kan akışı bozulmakta ve kalbe istenilen düzeyde oksijen sağlanamamaktadır. İlaç tedavisi veya risk faktörlerinin azaltılması gibi gerekli önlemler alınmadığında hasta akut miyokard infarktüsü (AMİ, kalp krizi) geçirebilmektedir. Bu kriz sonucunda miyokardiyal hasar meydana gelmektedir. Tüm bu süreçlerde miyokardiyal hasar öncesi ve sonrasında kalp, moleküler ve hücresele düzeyde fibrozis gibi bir takım yanıtlar geliştirmekte ve yeniden kendini koşullara adapte (remodelling) etmektedir (194). Akut miyokard infarktüsü sırasında kalp dokusundan çeşitli proteinler, enzimler, metabolitler ve RNA'lar dolaşıma salınmaktadır. Şu ana kadar elde edilen veriler kalp dokusundan salınan kardiyak troponin ve CK-MB gibi enzimleri miyokard infarktüsü tanısında kullanmamıza olanak sağlamıştır. Bu proteinler yaklaşık 24 saat ile 48 saat arasında kan dolaşımında kalmakta ve miyokard infarktüsünün erken ve geç fazlarını değerlendirmede yeterli olmamaktadır (195). Bundan dolayı miyokard infarktüsüne bağlı ölümler önlenememektedir.

Gen düzenleyici etkilere sahip olan miRNA'lar normal koşullarda, hücrelerdeki fizyolojik etkilere katkıda bulunurken ani ya da sürekli değişen koşullarda suprafizyolojik düzeylere ulaşmakta ve etkileri fenotipe yansıtmaktadır (88). Kanser başta olmak üzere alzheimer, parkinson ve kalp yetmezliği gibi birçok hastalıkta miRNA'ların etkileri incelenmiştir (196). Örneğin, kanser gibi sürekli farklılaşan dokularda miR-21 düzeyleri, normal dokulara göre yüksek bulunmuştur (197). Akut miyokard infarktüsü geçiren hastalarda miR-1 ve miR-133a serum düzeyleri kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (198, 199). MikroRNA'ların kalp ile ilgili çalışmaları daha çok kardiyak remodelling süreçleri üzerindeki etkilerine odaklanmıştır. Yapılan çalışmalarda miRNA'ların kardiyak hasarı ön görmede, rejenerasyonda, ritmin düzenlenmesinde, kalp büyümesinde ve miyokard infarktüsün erken ve geç fazlarının değerlendirilmesinde (kalp krizinin erken teşhisinde) önemli potansiyellere sahip olduğu bildirilmiştir (200-202). Bu kapsamda miRNA'ların kardiyak belirteç olarak değerlendirilebileceği ön görülmektedir. Yapılan çalışmalar ile kalp ile ilişkili birçok durumda etkisi olduğu gösterilen başta miR-1, miR-133 ve miR-208 olmak üzere çeşitli miRNA'lar belirlenmiş ve "kardiyospesifik miRNA"lar olarak adlandırılmışlardır. Bu miRNA'ların hücrel ve moleküler düzeydeki etkileri kısmende olsa da anlaşılmıştır (6).

Biz çalışmamızda kardiyospesifik miRNA'lardan ziyade, daha önce yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda iskemi/reperfüzyonuyla ilişkisi olduğu gösterilen miR-21-5p, miR-199a-5p, miR-199b-5p, miR-181a-5p ve miR-320a-5p miRNA'ları seçtik (122, 123). Böylelikle hem iskemik koşullarda değişen miRNA düzeylerini değerlendirdik, hem de bu miRNA'ların koroner arter hastalarında iskemik koşullarda belirteç olarak değerlendirilebileceğine dair veriler elde ettik.

MikroRNA-21, kanser hücrelerinde proliferatif ve antiapoptik etkisi nedeniyle onkojenik kabul edilen ve son 10 yılda kardiyovasküler hastalıklarda da çalışılmış miRNA'lardan birisidir (146, 203). Kardiyovasküler hastalıklarda en önemli etkisi hipertrofi ve fibrozis üzerine olan etkileridir. Kültüre edilen kardiyomiyositlerde miR-21 inhibisyonunun kardiyomiyosit hipertrofisinde negatif etkiye sahip olduğu görülmüştür (148). Antagomir yaklaşımı ile miR-21 inhibisyonunun kardiyak hipertrofiyi ve fibrozisi azalttığı bulunmuştur (149). MikroRNA-21'in hipertrofi ve fibrozise olan katkıları myokardiyal iskemi ve kalp yetmezliği gibi kardiyak remodelling süreçlerinin dahil olduğu durumlarda belirgin olmaktadır. Yin ve ark. tarafından I/R'nin indüklediği kalp hasarına karşı miR-21'in koruyucu etkileri *in vivo* olarak gösterilmiştir (204). Başlangıçta kardiyak hasarı

önlemede faydalı olan bu etki hasara neden olan etkiler devam ettiğinde veya yinelediğinde zararlı hale gelmektedir. Ren ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada unstabil anjinal hastalar ile kontrol grubunda miRNA düzeyleri karşılaştırılmış ve miR-21 düzeylerinin önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (205). Han ve ark., apo E proteinin nakavt edildiği ateroskleroz modeli farelerde (Apo E-/-) miR-21 düzeylerini yüksek bulmuşlardır. Aynı çalışmada 32 koroner arter hastası ve 20 kontrol bireyin miR-21 düzeyleri de ölçülmüş ve koroner arter hastalarında kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (206). Kalp yetmezliği olan hasta ve kontrol grubunun karşılaştırıldığı bir çalışmada hem periferal venden, hem de koroner sinüsten toplanan serum örneklerinde miR-21 ile beyin natriüretik peptid düzeyleri ölçülmüş ve her iki yerde de miR-21 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca miR-21 düzeylerinin, ejeksiyon fraksiyonu ve beyin natriüretik peptid düzeyleri ile de korele olduğu görülmüştür (207). Zhang ve ark. akut miyokard infarktus geçiren hasta grubunda yapmış olduğu bir çalışmada miR-21 ile kardiyak troponin ($r=0.962$, $p<0.001$), CK ($r=0.958$, $p<0.001$) ve CK-MB ($r=0.938$, $p<0.001$) gibi kardiyak belirteçler arasında güçlü korelasyonlar bulmuşlardır (208).

Yaptığımız çalışmada hasta grubunda operasyon öncesi miR-21-5p ile operasyon öncesi kardiyak troponin değerleri arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki bulundu ($r=0.344$, $p=0.019$). Operasyon sonrası 24. saat miR-21-5p değerleri ile 1. saatte ölçülen kardiyak troponin değerleri arasında negatif yönde zayıf bir ilişki bulundu ($r=-0.380$, $p=0.009$). Ancak miR-21-5p ile CK-MB değerleri arasında herhangi bir korelasyon bulunmadı. Bilindiği üzere kardiyak belirteçler akut myokard infarktüsü sırasında yükselmektedir. Bizim hasta grubumuz akut olmayıp myokard infarktüsü öyküsü olanlar arasından seçildi. MikroRNA-21-5p düzeyleri ile kardiyak belirteçler arasında güçlü korelasyon bulunamamasının nedenin bu olduğunu düşünmekteyiz. Diğer taraftan çalışmamızda miR-21-5p düzeyleri koroner arter hastalarında kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p<0.001$). Ayrıca koroner arter hastalarında operasyon öncesi ve sonrası miR-21-5p düzeyleri kendi arasında karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Bu sonuçlar, daha önce çalışmalarda koroner arter hastalarında ve kalp yetmezliği olan hastalarda miR-21-5p düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu yönündeki sonuçlarla uyumsuzdur. Bunun nedeninin miR-21-5p düzeylerinin kardiyak belirteçlerle korele olarak değişmesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Operasyon öncesi miR-21-5p değerlerinin ROC analizi yapıldığında ROC eğrisi altındaki alan (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.680-0.857) 0.777, duyarlılık %65 ve özgüllük %87.50 bulundu. Çalışmamızdaki hasta grubundaki miR-21'in tanısal değeri orta olarak değerlendirilebilir. Zhang ve ark. akut myokard infarktus geçiren hasta grubunda miR-21'in ROC eğrisi altındaki alanı (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.823-0.961) 0.892 bulmuşlardır (208). Unstabil anjinal hastalar ile kontrol grubunun karşılaştırıldığı bir çalışmada miR-21 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ($p<0.001$) olup ROC eğrisi altındaki alanın (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.666-0.822) 0.744 olduğu görülmüştür (209).

MikroRNA-199a-5p dinamin genlerinin intronlarında lokalize, kanser, beyin, karaciğer ve kardiyovasküler sistemde özellikle kardiyomiyositlerde ve endotel hücrelerinde eksprese edilmektedir. Kanser başta olmak üzere kardiyovasküler hastalıklarla olan ilişkisi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Kanser çalışmalarında miR-199a-5p ile Hif-1a arasında zıt bir ilişki bulunmuştur. Ding ve ark. yaptığı çalışmada miR-199a-5p'nin Hif1-a'yı hedeflemesi ile hipoksinin indüklediği küçük hücreli olmayan akciğer kanserini baskılandığı gösterilmiştir (210). Yang ve ark. melanoma hastalarından alınan örneklerde miR-199a-5p'nin düşük eksprese edildiğini bulmuşlardır. Aynı çalışmada kanser hücre hatlarında miR-199a-5p ekspresyonu indüklenerek hücre proliferasyonunun baskılandığını gösterilmiştir (211).

Hipoksik koşullar ile miR-199a-5p'nin ilişkisinin kurulduğu bir başka çalışmada Rane ve ark., hipoksiye maruz kalan kardiyomiyositlerde miR-199a-5p'nin dakikalar içerisinde analiz edilemez düzeyde azaldığını göstermişlerdir. MikroRNA-199a-5p'nin Hif1 α ve sirtuin1 (Sirt1) genlerini dolaylı olarak hedeflediği ve inhibe ettiği, bununla beraber hipoksik koşullar altındaki miyositlerde miR-199a-5p düzeylerinin azalması için bu genlerin ekspresyonunun artmasının gerekli olduğunu da göstermişlerdir. Ayrıca Hif-1 α 'nın negatif düzenleyicisi olan prolil hidroksilaz-2'nin Sirt1 tarafından proteozomal yıkıma uğradığı ve bu sayede Hif-1 α 'nın stabilize halde kaldığı bulunmuştur (180). Hipoksik hasardaki rolüne ek olarak kardiyak miyositlere miR-199a'nın transfeksiyonu hipertrofi ile sonuçlanmaktadır (181). Jansen ve ark. yapmış olduğu prospektif çalışmada, dolaşımda bulunan mikroveziküllerdeki miR-199a düzeylerinin yüksekliğinin stabil koroner arter hastalarındaki kardiyovasküler olay riskinin azalması ile ilişkili olduğu bulunmuştur (212). Yapılan çalışmalar göz önünü alındığında kanser ve

kardiyomiyositlerde Hif-1 α ile miR-199a-5p arasında ilişkinin olduğu ve miR-199a-5p'nin kardiyak hipertrofide rol oynadığı görülmektedir. Yaptığımız çalışmada daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak, miR-199a-5p düzeyleri koroner arter hastalarında kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p<0.001$). Hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrasındaki miR-199a-5p değişimleri değerlendirildiğinde sadece 1. ve 24. saatler arasında anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.044$). Operasyondan 1 saat sonra düzeyleri artan miR-199a'nın ortamdaki Hif-1 α 'yı parçalayarak doyumluğa ulaştığı, daha sonra düzeylerinin azaldığını düşünmekteyiz.

Hasta grubunda operasyondan 24 saat sonraki miR-199a-5p değerleri ile operasyondan 1 saat sonra ölçülen kardiyak troponin değerleri arasında negatif yönde orta şiddette bir ilişki bulundu ($r=-0.469$, $p=0.001$). MikroRNA-199a-5p değerleri ile CK-MB değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Yaptığımız çalışma miR-199a-5p ile kardiyak belirteçlerin birlikte değerlendirildiği ilk çalışma olmaktadır. Operasyon öncesi miR-199a-5p değerlerinin ROC analizi yapıldığında ROC eğrisi altındaki alan (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.716-0.883) 0.810 bulundu. Operasyon öncesi miR-199a-5p değerlerinin duyarlılığı %86.96 ve özgüllüğü %68.75 bulundu. Elde edilen verileri değerlendirdiğimizde miR-199a-5p düzeyleri koroner arter hastaları için önemli bir belirteç olabilir. Farklı koroner arter hastalığına sahip hastalarda miR-199a-5p düzeyleri değerlendirilerek hastalığın şiddeti ile ilişkiler kurulabilir.

Kardiyak hipertrofide rol oynayan miRNA'lardan birisi de miR-199b-5p'dir. MikroRNA-199b-5p'nin hücrel düzeydeki etkileri miR-199a-5p'den farklıdır. MikroRNA-199b, kalsinörin geni ve aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT) ile birlikte kalp gibi çeşitli organların gelişiminde önemli roller üstlenmektedir (183, 184). MikroRNA-199b'nin, çift-özgüllükte tirozin fosforilasyonu düzenleyici kinaz 1A (DYRK1A)'yı hedefleyerek kalsinörin/NFAT sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (183). DYRK1A, normalde NFAT'ın negatif bir düzenleyicisidir (213). Dolayısıyla miR-199b-5p kardiyak gelişim ve hipertrofinin gelişmesinde rol oynamaktadır. Farelerde yapılan bir çalışmada miyokard infarktüs sonrası miR-199b düzeylerinin aşırı eksprese edildiği ve infarkt bölgesinin sınırlarında fibrozis geliştiği gözlenmiştir. MikroRNA-199b'nin farmakolojik olarak inhibe edilmesiyle de kalp fonksiyonunun iyileştiği gösterilmiştir (186). MikroRNA-199b'nin kalp ile ilişkisinin değerlendirildiği çalışmalar sınırlı olup yapılan çalışmalar incelendiğinde kardiyak hipertrofiye katkı sağladığı görülmüştür. Kalple ilgili yapılan çalışmaların dışında sinir

sisteminin inflamatuvar yanıtında miR-199b-5p'nin nükleer faktör kappa- β (NF- κ B) sinyal yolağını düzenlediği ve nörodejeneratif hastalığı baskıladığı rapor edilmiştir (214). Yapılan bir başka çalışmada lipopolisakkarit ile muamele edilen monositlerde miR-199b-5p düzeylerinde önemli azalmanın görüldüğü NF- κ B yolağının aktivasyonu ile GSK3 β ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Çalışmada miR-199b-5p'nin GSK3 β 'yı hedeflediği ve NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği bundan dolayı miR-199b-5p'nin antiinflamatuvar etkisinin olduğu ifade edilmiştir (215). Yaptığımız çalışmada miR-199b-5p düzeyleri koroner arter hastalarında kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p < 0.001$). MikroRNA-199b-5p'nin düşük olması, NF- κ B inhibisyonunu engelleyerek inflamasyonun artmasına neden olarak koroner arter hastalığının patogeneze katılıyor olabilir. Diğer taraftan koroner arter hastalarında operasyon öncesi ve sonrası miR-199b-5p düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Çalışmamızda miR-199b-5p ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasındaki korelasyonlar incelendiğinde hasta grubunda operasyon öncesi ve sonrası miR-199b-5p ile kardiyak troponin ve CK-MB değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Operasyon öncesi miR-199b-5p değerlerinin ROC analizi yapıldığında ROC eğrisi altındaki alan (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.714-0.882) 0.808 bulundu. Operasyon öncesi miR-199b-5p değerlerinin duyarlılığı %82.61 ve özgüllüğü %72.92 bulundu. Bu verilere göre miR-199b-5p düzeyleri koroner arter hastaları için önemli bir belirteç olabilir. Literatür taraması yaptığımızda miR-199b-5p düzeylerinin koroner arter hastalarında incelenmediği görüldü. Bundan dolayı çalışmamız koroner arter hastalarında bypass greft öncesi ve sonrasında miR-199b-5p düzeylerinin ve kardiyak belirteçler ile korelasyonunun incelendiği ilk çalışmadır. Koroner arter hastalarında miR-199b-5p düzeylerinin değerlendirilmesi ve bulduğumuz sonucun desteklenmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

miR-320a kanser ve kalp hastalıklarında çalışılan miRNA'lardan birisidir. Kalp hastalıklarında düzeylerinin değiştiği gösterilmiş, ancak sınırlı sayıda hasta gruplarında çalışılmıştır. Akut miyokard infarktüsünde ve akut koroner sendromlu hastalarda kontrol grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur (165, 216). Yapılan bir başka çalışmada koroner arter hastalarında ve riskli hastalarda miRNA profillemesi yapılmış ve miR-320a'nın kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve yine aynı çalışmada miR320a'nın ateroskleroza teşvik ettiği, serum yanıt faktör genini hedeflediği ve apoptozu indüklediği bulunmuştur (168). Yapılan bir başka çalışmada miR-320a'nın downregülasyonunun

kardiyomiyosit apoptozunu baskıladığı ve insülin benzeri büyüme faktörü 1'i (IGF-1) hedefleyerek miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir (217). Yapılan bir başka çalışmada insan umbilikal ven endotelial hücreleri osilatör gerim stresine maruz bırakılmış ve gelişen inflamasyon sonucunda miR-320a'nın da dahil olduğu 10 miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin değiştiği ve miR-320a'nın downregüle olduğu bulunmuştur (218). Cheng ve ark. yaptığı bir çalışmada proinflamatuvar sitokinlerin aşırı ifade edildiği myastenia gravis hastalarında miR-320a'nın downregüle olduğu ve miR-320a'nın downregülasyonunun siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunu artırarak proinflamatuvar sitokinlerin aşırı ekspresyonunu indüklediğini bulmuşlardır (219). Yapmış olduğumuz çalışmada miR-320a düzeyleri koroner arter hastalarında kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p<0.004$). Koroner arter hastalarında miR-320a düzeylerinin düşük çıkması proinflamatuvar sitokinlerin yüksek olmasından ve iskemik sürecin devam etmesinden dolayı olabilir. Koroner bypass greft tedavisi öncesi ve sonrasındaki miR-320a değişimleri arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Bu sonuca göre iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkinin devam ettiğini düşünmekteyiz. Diğer taraftan çalışmamızın hasta grubunda operasyon öncesi miR-320a düzeyleri ile operasyon öncesi kardiyak troponin değerleri arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki bulundu ($r=0.318$, $p=0.031$). MikroRNA-320a değerleri ile CK-MB değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Kardiyojenik şoklu hastalarda miR-320a'nın da değerlendirildiği bir çalışmada kardiyak troponin T ile ilgili herhangi bir korelasyon bulunamazken, laktat düzeyleri arasında zayıf bir korelasyon bulunmuştur (216). Operasyon öncesi miR-320a değerlerinin ROC analizi yapıldığında eğri altında kalan alan (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.688-0.863) 0.784, duyarlılık %73.91 ve özgüllük %81.25 bulundu. Bu sonuç miR-320a için koroner arter hastalarında yapılan ilk ROC analizidir ve elde ettiğimiz verilere göre koroner arter hastalarında diagnostik değere sahip olabileceğini öngörmekteyiz.

MikroRNA-181a, memeli beyinde yüksek düzeyde ifade edilen miR-181 ailesinin üyesidir (220). MikroRNA-181 ailesi immün modülasyon ve inflamasyon gibi çeşitli biyolojik olaylarda önemli rollere sahiptir (172). Moon ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada miR-181a inhibisyonunun önbeyinde iskeminin indüklediği nöronal kaybı azalttığı, antiapoptik protein olan bcl-2 düzeylerini arttırdığı bulunmuştur (221). Yapılan bir başka çalışmada miR-181a-5p'nin aterosklerotik damarlarda normal damarlara göre upregüle olduğu bulunmuştur (173). Nörojenik hipertansiyon modeli Schlager BHP/2J

farelerinde, miR-181a düzeylerinin düşük, renin mRNA düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür (222). Zhu ve ark. yaptığı bir çalışmada akut miyokard infarktüsü geçiren, unstabil anjinalı ve kontrol grubunda dolaşımdaki miR-181a düzeyleri değerlendirilmiş ve miR-181a düzeyleri miyokard infarktüsü geçiren grupta diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada AMI geçiren grupta miR-181a düzeylerinin kardiyak troponin I ($r=0.514$, $p<0.05$) ve kreatinin kinaz MB ($r=0.432$, $p<0.05$) değerleri ile pozitif, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile negatif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Çalışmada miR-181a düzeylerinin ROC analizi yapılmış ve ROC eğrisi altındaki alan (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.756-0.912) 0.834 bulunarak akut myokard infarktüsünün teşhisinde biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği öne sürülmüştür (123). Bizim çalışmamızda miR-181a düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p<0.001$). Bypass greft ile sağlanan reperfüzyon sonucunda miR-181a düzeyleri arasında operasyon öncesine göre bir değişiklik görülmedi ($p>0.05$) Yani miR-181a-5p oksijenlenme durumlarına göre farklı bir adaptasyon göstermedi. Koroner arter hastalarında operasyondan sonra ölçülen miR-181a-5p değerleri ile kardiyak troponin değerleri arasında negatif yönde zayıf bir ilişki ($r=-0.331$, $p=0.025$ - $r=-0.361$, $p=0.014$) bulundu. Operasyondan sonra ölçülen miR-181a-5p değerleri ile operasyon öncesi ve sonrası CK-MB değerleri arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki bulundu ($r=0.306$, $p=0.039$ - $r=0.321$, $p=0.030$). Operasyon öncesi miR-181a-5p değerlerinin ROC analizi yapıldığında ROC eğrisi altındaki alan (AUC) %95 doğruluk aralığında (0.687-0.862) 0.784 bulundu. Operasyon öncesi miR-181a değerlerinin duyarlılığı %63.04 ve özgüllüğü %85.42 bulundu. Bu sonuçlarla koroner arter hastalarında miR-181a-5p'nin diagnostik değerleri anlamlılık ifade etmektedir. Dolayısıyla yeni çalışmalar ile desteklenirse koroner arter hastalarında belirteç olarak değerlendirilebilir. Yapılan çalışmalarla miR-181a'nın oksidatif stres ve inflamatuvar süreçlerde rol oynadığı görülmüştür (223). MikroRNA-181a-5p ekspresyonu düşük olduğunda antiinflamatuvar sitokinler olan TGF- β ve IL-10 düzeylerinin düşük olduğu proinflamatuvar sitokinler olan IL-6 ve TNF- α düzeylerinin ise yüksek olduğu tespit edilmiştir (224). Çalışmamızda miR-181a-5p'nin düşük bulunmasının olası sebebi koroner arter hastalığının patogenezinde rol oynayan bu proinflamatuvar ve antinflamatuvar sitokinler düzeylerinin değişmiş olması olabilir. Koroner arter hastalığında proinflamatuvar sitokinlerin eşlik etmesinden dolayı miR-181a-5p düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük çıktığı düşünülmektedir. MikroRNA-181a'nın

kardiyovasküler hastalıklardaki rolü yeterince aydınlatılmamış olup yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak:

- miR-21-5p, miR-320a, miR-199a-5p, miR-199b-5p ve miR-181a-5p düzeyleri koroner arter hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu.
- miR-21-5p düzeylerinin kardiyak belirteçlerle korele olarak değişebileceği sonucuna varıldı.
- miR-320a, miR-199b-5p ve miR-181a-5p düzeylerinin koroner arter hastalığının patojenezine katılan inflamasyon ile ilişkili yolakların aktive olmasında rolü olabileceği sonucuna varıldı.
- miR-199b-5p koroner arter hastalarında ilk kez değerlendirilmiş olup, düzeyi kontrol grubuna göre düşük bulundu.
- Operasyon öncesindeki ve sonrasındaki miR-21-5p, miR-320a, miR181a-5p ve miR199b-5p düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı. Bu miRNA'ların reperfüzyona bağlı olarak düzeylerinin değişmediği sonucuna varıldı.
- miR-199a-5p'nin 24. saatte 1. saate göre anlamlı olarak azaldığı bulundu ($p<0.044$). Operasyondan 1 saat sonra düzeyleri artan miR-199a-5p'nin ortamdaki Hif-1 α 'yı parçalayarak doygunluğa ulaştığı daha sonra düzeylerinin azaldığını düşünmekteyiz.
- Çalışmamızdaki miR-199a-5p düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre düşük bulundu. MikroRNA-199a-5p'nin iskemi/reperfüzyon ile güçlü ilişkileri olduğunu sonucuna varıldı.
- Yapılan ROC analizlerinde, miR-199a-5p'nin koroner arter hastalarındaki tanısal değeri 0.810 bulundu. Elde edilen sonuca göre miR-199a-5p'nin koroner arter hastalığının şiddetinin belirlenmesinde belirteç olarak değerlendirilebileceği sonucuna varıldı.
- Koroner arter hastalarında kardiyak belirteçler ile miRNA'lar arasındaki korelasyonun zayıf olduğu görüldü. Çalışmamızdaki miRNA'lar ile kardiyak belirteçler arasında ilişki olmadığının sonucuna varıldı.

6. KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). World Heart Day. [Elektronik kaynak]. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/. Kasım 2018.
2. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Chiuve SE, Cushman M, Delling FN, Deo R, de Ferranti SD, Ferguson JF, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Lutsey PL, Mackey JS, Matchar DB, Matsushita K, Mussolino ME, Nasir K, O'Flaherty M, Palaniappan LP, Pandey A, Pandey DK, Reeves MJ, Ritchey MD, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sampson UKA, Satou GM, Shah SH, Spartano NL, Tirschwell DL, Tsao CW, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS and Muntner P. Heart disease and stroke statistics-2018 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137(12):E67-E492.
3. World Health Organization (WHO). About cardiovascular diseases. [Elektronik kaynak]. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/en/. Kasım 2018.
4. Onat A ve Can G. Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı, yeni koroner olaylar ve kalpten ölüm sıklığı. Onat E (editör) *Tıp Dünyasının Kronik Hastalıklara Yaklaşımına Öncülük*, İstanbul: Logos Yayıncılık, 2017: p.21-28.
5. Joladarashi D, Thandavarayan RA, Babu SS and Krishnamurthy P. Small engine, big power: microRNAs as regulators of cardiac diseases and regeneration. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):15891-15911.
6. Chistiakov DA, Orekhov AN and Bobryshev YV. Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction). *J Mol Cell Cardiol*. 2016;94:107-121.
7. Mathers CD and Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *Plos Med*. 2006;3(11): e442
8. World Health Organization (WHO). Cardiovascular Diseases. [Elektronik kaynak]. http://www.who.int/nmh/publications/fact_sheet_cardiovascular_en.pdf. Kasım 2018.
9. Mendis S and Norrving B. Organizational update world health organization. *Stroke*. 2014;45(2):e22-e23.
10. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard

- VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D and Turner MB. Heart disease and stroke statistics-2014 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292.
11. Şencan İ, Keskinliç B, Ekinçi B, Öztemel A, Sarioğlu G, Çobanoğlu N, Yavaşoğlu B, Kapusuz A, Tokgözoğlu L, Abacı A, Şahin M, Aksoy M, Özer N, Aka SA, Akar R ve Şener E. Türkiye Kalp ve Damar Hastalıkları Önleme ve Kontrol Programı Eylem Planı. [Elektronik kaynak]. <https://www.tkd.org.tr/TKDDData/Uploads/files/Turkiye-kalp-ve-damar-hastaliklari-onleme-ve-kontrol-programi.pdf>. Kasım 2018.
 12. Sayols-Baixeras S, Lluís-Ganella C, Lucas G and Elosua R. Pathogenesis of coronary artery disease: focus on genetic risk factors and identification of genetic variants. *Appl Clin Genet*. 2014;7:15-32.
 13. Momiyama Y, Adachi H, Fairweather D, Ishizaka N and Saita E. Inflammation, Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. *Clin Med Insights Cardiol*. 2014;8(3):67-70.
 14. Ganguly P and Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J*. 2015;14:6
 15. Khan MA and Baseer A. Lipoprotein(a) status in coronary heart disease. *J Pak Med Assoc*. 2000;50(2):47-50.
 16. Mallika V, Goswami B and Rajappa M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: A clinicobiochemical perspective. *Angiology*. 2007;58(5):513-522.
 17. Türk Kardiyoloji Derneği Koroner Kalp Hastalıkları Korunma ve Tedavi Kılavuzu 2002 [Elektronik kaynak]. <http://www.tkd.org.tr/kilavuz/k11/4e423.htm>. Kasım 2018.
 18. Tokgözoğlu L. Ateroskleroz ve enflamasyonun rolü. *Türk Kardiyol Dern Arş*. 2009;37(4):1-6.
 19. Alper F, Gülbaran M ve Bayraktutan ÜG. Koroner ateroskleroz ve plakların tomografik morfolojisi. Okur A, Kantarcı M (editörler), MDBT Koroner Anjiyografi, İstanbul: Aktif yayınevi; 2006:93-99.
 20. Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM and Quyyumi AA. Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation*. 1998;98(1):17-24.

21. Demircan S. Ateroskleroz: Primer ve sekonder korunma. *Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi*. 2012;29:141-146.
22. Abbas AE. *Interventional Cardiology Imaging*. London: Springer, 2015: s.8-11.
23. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhater MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK and Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient - A call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation*. 2003;108(15):1772-1778.
24. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhater MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK and Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient - A call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*. 2003;108(14):1664-1672.
25. Spagnoli LG, Mauriello A, Sangiorgi G, Fratoni S, Bonanno E, Schwartz RS, Piepgras DG, Pistolese R, Ippoliti A and Holmes DR. Extracranial thrombotically active carotid plaque as a risk factor for ischemic stroke. *JAMA*. 2004;292(15):1845-1852.
26. Casscells W, Naghavi M and Willerson JT. Vulnerable atherosclerotic plaque - A multifocal disease. *Circulation*. 2003;107(16):2072-2075.
27. Glass CK and Witztum JL. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*. 2001;104(4):503-516.
28. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL and Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(25):2379-2393.

29. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ and Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(4):222-232.
30. Libby P, Ridker PM and Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(9):1135-1143.
31. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H and Yokode M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:199-205.
32. Li HG, Horke S and Forstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2014;237(1):208-219.
33. Blankenberg S, Barbaux S and Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2003;170(2):191-203.
34. Davignon J and Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23):27-32.
35. Galkina E and Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:165-197.
36. Pamukcu B, Lip GYH and Shantsila E. The nuclear factor - kappa B pathway in atherosclerosis: A potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. *Thromb Res.* 2011;128(2):117-123.
37. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K and Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2013;424:245-252.
38. Nilsson J, Hansson GK and Shah PK. Immunomodulation of atherosclerosis: implications for vaccine development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(1):18-28.
39. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1685-1695.
40. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A and Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death - A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscl Thromb Vas.* 2000;20(5):1262-1275.
41. Nakashima Y, Chen YX, Kinukawa N and Sueishi K. Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age. *Virchows Arch.* 2002;441(3):279-288.
42. Fan J and Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2003;10(2):63-71.

43. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN and Sueishi K. Early human atherosclerosis - Accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscl Throm Vas.* 2007;27(5):1159-1165.
44. Nakashima Y, Wight TN and Sueishi K. Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc Res.* 2008;79(1):14-23.
45. Katzung BG and Masters SB. Temel ve Klinik Farmakoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2016:s.193-194.
46. Homoud MK. Coronary artery disease. Tufts-New England Medical Center. 2008;1-13.
47. Crawford MH. Current Diagnosis & Treatment Cardiology, 4. baskı. Erol Ç, Ede H (Editörler). Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2017;p. 64-65.
48. Kalyoncuoğlu M, Öztürk S, Durmuş G, Keskin B ve Can MM. Güncel tedavi kılavuzları ışığında kronik iskemik kalp hastalığı tedavisine yaklaşım. *Med Bull Haseki.* 2017;55:85-100.
49. Crawford MH. Current Diagnosis & Treatment Cardiology, 4 baskı. Erol Ç, Ede H (Editörler). Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2017;p. 65-67.
50. Crawford MH. Current Diagnosis & Treatment Cardiology, 4 baskı. Erol Ç, Ede H (Editörler). Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2017;p. 68-69.
51. Cassar A, Holmes DR, Rihal CS and Gersh BJ. Chronic coronary artery disease: Diagnosis and management. *Mayo Clin Proc.* 2009;84(12):1130-1146.
52. Bakan E. Tanıda Laboratuvar. 2. baskı. İstanbul: Aktif Yayınevi; 2016:s. 39-54.
53. Yurter HE. RNA yapısı tipleri ve fonksiyonları. [Elektronik kaynak]. <http://www.tphd.org.tr/wp-content/uploads/2018/04/Hayat-Erdem-Yurter.pdf>. Kasım 2018.
54. Altınışık M. Gen ifadesi: replikasyon, transkripsiyon, translasyon, posttranslasyonel modifikasyonlar. [Elektronik kaynak]. <https://docplayer.biz.tr/44690315-Gen-ifadesi-replikasyon-transkripsiyon-translasyon-posttranslasyonel-modifikasyonlar.html>. Kasım 2018.
55. DNA, RNA, RNA çeşitleri ve protein sentezi. [Elektronik kaynak]. <http://www.biyolojidersnotlari.com/dna-rna-rna-cesitleri-ve-protein-sentezi.html>. Kasım 2018.
56. Kaikkonen MU, Lam MTY and Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res.* 2011;90(3):430-440.

57. Güzelgöl F ve Aksoy K. Kodlanmayan RNA'ların işlevi ve tıpta kullanım alanları. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2009;18(3):141-155.
58. Pauli A, Rinn JL and Schier AF. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. Nat Rev Genet. 2011;12(2):136-149.
59. Ergören MÇ. RNA'nın yapısı. [Elektronik kaynak]. http://docs.neu.edu.tr/staff/mahmutcerkez.ergoren/3.RNA%20Yapısı_DrErgoren_Dış%20Hekimliği_18.pdf. Kasım 2018.
60. RNA yapısı ve özellikleri. [Elektronik kaynak]. <https://www.slideshare.net/mbolmez/rna-yapisi-ve-zellikleri>. Kasım 2018.
61. Ebert MS, Neilson JR and Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. Nat Methods. 2007;4(9):721-726.
62. Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K and Hannon GJ. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. Science. 2007;316(5825):744-747.
63. Bachellerie JP, Cavaille J and Huttenhofer A. The expanding snoRNA world. Biochimie. 2002;84(8):775-790.
64. Meseure D, Alsibai KD, Nicolas A, Bieche I and Morillon A. Long noncoding RNAs as new architects in cancer epigenetics, prognostic biomarkers, and potential therapeutic targets. Biomed Res Int. 2015:320214.
65. Zhang BH, Pan XP, Cobb GP and Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol. 2007;302(1):1-12.
66. Filipowicz W, Bhattacharyya SN and Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet. 2008;9(2):102-114.
67. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-297.
68. Hwang HW and Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. Brit J Cancer. 2006;94(6):776-780.
69. Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. The C-Elegans heterochronic gene Lin-4 encodes small Rnas with antisense complementarity to Lin-14. Cell. 1993;75(5):843-854.
70. Wightman B, Ha I and Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene Lin-14 by Lin-4 mediates temporal Pattern-formation in C-Elegans. Cell. 1993;75(5):855-862.
71. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W and Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science. 2001;294(5543):853-858.

72. Lee Y, Ahn C, Han JJ, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S and Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-419.
73. Landthaler M, Yalcin A, and Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D-melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*. 2004;14(23):2162-2167.
74. Yi R, Qin Y, Macara IG and Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Gene Dev*. 2003;17(24):3011-3016.
75. Erkmann JA and Kutay U. Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp Cell Res*. 2004;296(1):12-20.
76. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K and Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005;436(7051):740-744.
77. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR and Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *Embo J*. 2006;25(3):522-532.
78. Siomi H and Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell*. 2010;38(3):323-332.
79. Hitit M, Kurar E ve Güzeloğlu A. MikroRNA biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*. 2015;10(3):211-218.
80. Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-233.
81. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB and Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92-105.
82. Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ and Chien S. MicroRNA: A master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu Rev Biomed Eng*. 2010;12:1-27.
83. Meister G. MiRNAs get an early start on translational silencing. *Cell*. 2007;131(1):25-28.
84. Paranjape T, Slack FJ and Weidhaas JB. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut*. 2009;58(11):1546-1554.
85. Brennecke J, Stark A, Russell RB and Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *Plos Biol*. 2005;3(3):e85.
86. Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES and Kellis M. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*. 2005;434(7031):338-345.

87. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR and Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-906.
88. Vidigal JA and Ventura A. The biological functions of miRNA's: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol*. 2015;25(3):137-147.
89. Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, Singer A and Postlethwait JH. MicroRNA nomenclature: A view incorporating genetic origins, biosynthetic pathways, and sequence variants. *Trends Genet*. 2015;31(11):613-626.
90. Olena AF and Patton JG. Genomic Organization of microRNAs. *J Cell Physiol*. 2010;222(3):540-545.
91. Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CDO, Palazzo S, Paterson JC, Cattan H, Enver T, Mager R, Boultonwood J, Wainscoat JS and Hatton CS. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2007;121(5):1156-1161.
92. Guo Q, Luan J, Li N, Zhang Z, Zhu X, Zhao L, Wei R, Sun L, Shi Y, Yin X, Ding N, Jiang G and Li X. MicroRNA-181 as a prognostic biomarker for survival in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(51):89130-89141.
93. Gururajan A, Naughton ME, Scott KA, O'Connor RM, Moloney G, Clarke G, Dowling J, Walsh A, Ismail F, Shorten G, Scott L, McLoughlin DM, Cryan JF and Dinan TG. MicroRNAs as biomarkers for major depression: a role for let-7b and let-7c. *Transl Psychiatry*. 2016;6(8):e862.
94. Rizos E, Siafakas N, Katsantoni E, Skourti E, Salpeas V, Rizos I, Tsoporis JN, Kastania A, Filippopoulou A, Xiros N, Margaritis D, Parker TG, Papageorgiou C and Zoumpourlis V. Let-7, mir-98 and mir-181 as biomarkers for cancer and schizophrenia. *Plos One*. 2015;10(4):e0123522.
95. Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y and Iwai N. Plasma miR-208 as a Biomarker of Myocardial Injury. *Clin Chem*. 2009;55(11):1944-1949.
96. Shi J. Considering exosomal miR-21 as a biomarker for cancer. *J Clin Med*. 2016;5(4):42.
97. Kumar B and Lupold SE. MicroRNA expression and function in prostate cancer: a review of current knowledge and opportunities for discovery. *Asian J Androl*. 2016;18(4):559-567.
98. Kumar S, Vijayan M and Reddy PH. MicroRNA-455-3p as a potential peripheral biomarker for Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2017;26(19):3808-3822.

99. Singh A, Patro PS and Aggarwal A. MicroRNA-132, miR-146a, miR-155 as potential biomarkers of methotrexate response in patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2017;198(1).
100. Izarra A, Moscoso I, Levent E, Canon S, Cerrada I, Diez-Juan A, Blanca V, Núñez-Gil JJ, Valiente I, Ruiz-Sauri A, Sepúlveda P, Tiburcy M, Zimmermann WH and Bernad A. MiR-133a enhances the protective capacity of cardiac progenitors cells after myocardial infarction. *Stem Cell Reports.* 2014;3(6):1029-1042.
101. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C and Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2007;13(5):613-618.
102. Cavarretta E and Condorelli G. miR-21 and cardiac fibrosis: another brick in the wall? *Eur Heart J.* 2015;36(32):2139-21341.
103. Luo X, Lin H, Pan Z, Xiao J, Zhang Y, Lu Y, Yang B and Wang Z. Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *J Biol Chem.* 2008;283(29):20045-20052.
104. Kakimoto Y, Tanaka M, Kamiguchi H, Hayashi H, Ochiai E and Osawa M. MicroRNA deep sequencing reveals chamber-specific miR-208 family expression patterns in the human heart. *Int J Cardiol.* 2016;211:43-8.
105. Yan S and Jiao K. Functions of miRNAs during mammalian heart development. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5):789.
106. Wang J, Liew OW, Richards AM and Chen YT. Overview of microRNAs in cardiac hypertrophy, fibrosis, and apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5):749.
107. Thum T and Lorenzen JM. Cardiac fibrosis revisited by microRNA therapeutics. *Circulation.* 2012;126(7):800-802.
108. Gnecci M, Pisano F and Bariani R. microRNA and cardiac regeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2015;887:119-141.
109. Fan Z and Guan J. Antifibrotic therapies to control cardiac fibrosis. *Biomater Res.* 2016;20:13.
110. Mishra PK. Is Mir-133a a promising therapeutic target for heart failure?. *J Diabetes Metab.* 2014;5(8):e118.
111. Elia L, Contu R, Quintavalle M, Varrone F, Chimenti C, Russo MA, Cimino V, De Marinis L, Frustaci A, Catalucci D and Condorelli G. Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and

- skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation*. 2009;120(23):2377-2385.
112. Kim GH. MicroRNA regulation of cardiac conduction and arrhythmias. *Transl Res*. 2013;161(5):381-392.
 113. Karakikes I, Chaanine AH, Kang SJ, Mukete BN, Jeong DT, Zhang SH, Hajjar RJ and Lebeche D. Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(2):e000078.
 114. Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH and Wang DZ. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(9):2772-2786.
 115. van Rooij E, Sutherland LB, Qi XX, Richardson JA, Hill J and Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007;316(5824):575-579.
 116. Vegter EL, van der Meer P, de Windt LJ, Pinto YM and Voors AA. MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy. *Eur J Heart Fail*. 2016;18(5):457-468.
 117. Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN and van Rooij E. Therapeutic Inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation*. 2011;124(14):1537-1547.
 118. Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE and Blaxall BC. Cardiac fibrosis: The fibroblast awakens. *Circ Res*. 2016;118(6):1021-1040.
 119. Sassi Y, Avramopoulos P, Ramanujam D, Grüter L, Werfel S, Giosele S, Brunner AD, Esfandyari D, Papadopoulou AS, De Strooper B, Hübner N, Kumarswamy R, Thum T, Yin X, Mayr M, Laggerbauer B and Engelhardt S. Cardiac myocyte miR-29 promotes pathological remodeling of the heart by activating Wnt signaling. *Nat Commun*. 2017;8(1):1614.
 120. Brosh D, Assali AR, Mager A, Porter A, Hasdai D, Teplitsky I, Rechavia E, Fuchs S, Battler A and Kornowski R. Effect of no-reflow during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction on six-month mortality. *Am J Cardiol*. 2007;99(4):442-445.
 121. Turer AT and Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol*. 2010;106(3):360-368.

122. Fan ZX and Yang J. The role of microRNAs in regulating myocardial ischemia reperfusion injury. *Saudi Med J*. 2015;36(7):787-793.
123. Zhu J, Yao K, Wang Q, Guo J, Shi H, Ma L, Liu H, Gao W, Zou Y and Ge J. Circulating miR-181a as a potential novel biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem*. 2016;40(6):1591-1602.
124. Calvo-Garrido J, Carilla-Latorre S, Lazaro-Diequez F, Egea G and Escalante R. Vacuole membrane protein 1 is an endoplasmic reticulum protein required for organelle biogenesis, protein secretion, and development. *Mol Biol Cell*. 2008;19(8):3442-3453.
125. Fujita S, Ito T, Mizutani T, Minoguchi S, Yamamichi N, Sakurai K and Iba H. MiR-21 gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol*. 2008;378(3):492-504.
126. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W and Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002;12(9):735-739.
127. Thum T, Galuppo P, Kneitz S, Fiedler J, Wolf C, Van Laake L, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S and Ertl G. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*. 2007;116(3):258-267.
128. Zhang CX. MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genomics*. 2008;33(2):139-147.
129. Crunkhorn S. Silencing microRNA rescues the heart. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(2):108-109.
130. Jin XL, Sun QS, Liu F, Yang HW, Liu M, Liu HX, Xu W and Jiang YY. MicroRNA 21-mediated suppression of sproutyl by Pokemon affects liver cancer cell growth and proliferation. *J Cell Biochem*. 2013;114(7):1625-1633.
131. Sayed D, Rane S, Lypowy J, He M, Chen IY, Vashistha H, Yan L, Malhotra A, Vatner D and Abdellatif M. MicroRNA-21 targets Sproutyl and promotes cellular outgrowths. *Mol Biol Cell*. 2008;19(8):3272-3282.
132. Kwak HJ, Kim YJ, Chun KR, Woo YM, Park SJ, Jeong JA, Jo SH, Kim TH, Min HS, Chae JS, Choi EJ, Kim G, Shin SH, Gwak HS, Kim SK, Hong EK, Lee GK, Choi KH, Kim JH, Yoo H, Park JB and Lee SH. Downregulation of Spry2 by miR-21 triggers malignancy in human gliomas. *Oncogene*. 2011;30(21):2433-2442.
133. Weber M, Baker MB, Moore JP and Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Bioph Res Co*. 2010;393(4):643-648.

134. Meng FY, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST and Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(2):647-658.
135. Pezzolesi MG, Platzer P, Waite KA and Eng C. Differential expression of PTEN-targeting microRNAs miR-19a and miR-21 in Cowden Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008;82(5):1141-1149.
136. Kolpa HJ, Peal DS, Lynch SN, Giokas AC, Ghatak S, Misra S, Norris RA, Macrae CA, Markwald RR, Ellinor P, Bischoff J and Milan DJ. MiR-21 represses Pcd4 during cardiac valvulogenesis. *Development*. 2013;140(10):2172-2180.
137. Chuppa S, Liang M, Liu P, Liu Y, Casati MC, Cowley AW, Patullo L and Kriegel AJ. MicroRNA-21 regulates peroxisome proliferator-activated receptor alpha, a molecular mechanism of cardiac pathology in cardiorenal syndrome Type 4. *Kidney Int*. 2018;93(2):375-389.
138. Kida K, Nakajima M, Mohri T, Oda Y, Takagi S, Fukami T and Yokoi T. PPAR alpha Is Regulated by miR-21 and miR-27b in Human Liver. *Pharm Res*. 2011;28(10):2467-2476.
139. Zhu S, Si ML, Wu H and Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 2007;282(19):14328-14336.
140. Wang M, Li W, Chang GQ, Ye CS, Ou JS, Li XX, Liu Y, Cheang TY, Huang XL, Wang SM. MicroRNA-21 regulates vascular smooth muscle cell function via targeting tropomyosin 1 in arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(9):2044-2053.
141. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB and Zhang C. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*. 2007;100(11):1579-1588.
142. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM and Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(2):449-471.
143. Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J and Zhang C. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(1):5-14.
144. Liu X, Meng H, Jiang C, Yang S, Cui F and Yang P. Differential microRNA expression and regulation in the rat model of post-infarction heart failure. *Plos One*. 2016;11(8):e0160920.

145. Mukhopadhyay P, Mukherjee S, Ahsan K, Bagchi A, Pacher P and Das DK. Restoration of altered microRNA expression in the ischemic heart with resveratrol. *Plos One*. 2010;5(12): e15705.
146. Duygu B and Martins PAD. miR-21: a star player in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2015;105(3):235-237.
147. Martins PAD and De Windt LJ. MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2012;93(4):563-572.
148. Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB and Zhang C. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart - Do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol*. 2007;170(6):1831-1840.
149. Mason JM, Morrison DJ, Basson MA and Licht JD. Sprouty proteins: multifaceted negative-feed back regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol*. 2006;16(1):45-54.
150. Edwin F, Singh R, Endersby R, Baker SJ and Patel TB. The tumor suppressor PTEN is necessary for human sprouty 2-mediated inhibition of cell proliferation. *J Biol Chem*. 2006;281(8):4816-4822.
151. Lao DH, Yusoff P, Chandramouli S, Philp RJ, Fong CW, Jackson RA, Saw TY, Yu CY, and Guy GR. Direct binding of PP2A to Sprouty2 and phosphorylation changes are a prerequisite for ERK inhibition downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation. *J Biol Chem*. 2007;282(12):9117-9126.
152. Bang C, Batkai S, Dangwal S, Gupta SK, Foinquinos A, Holzmann A, Just A, Remke J, Zimmer K, Zeug A, Ponimaskin E, Schmiedl A, Yin X, Mayr M, Halder R, Fischer A, Engelhardt S, Wei Y, Schober A, Fiedler J and Thum T. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2014;124(5):2136-2146.
153. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J and Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*. 2008;456(7224):980-984.
154. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, and Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *P Natl Acad Sci USA*. 2008;105(35):13027-13032.

155. Dong S, Cheng Y, Yang J, Li J, Liu X, Wang X, Wang D, Krall TJ, Delphin ES and Zhang C. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biol Chem*. 2009;284(43):29514-59525.
156. Yin C, Salloum FN and Kukreja RC. A novel role of microRNA in late preconditioning upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70. *Circ Res*. 2009;104(5):572-575.
157. Sygitowicz G, Tomaniak M, Blaszczyk O, Koltowski L, Filipiak KJ and Sitkiewicz D. Circulating microribonucleic acids miR-1, miR-21 and miR-208a in patients with symptomatic heart failure: Preliminary results. *Arch Cardiovasc Dis*. 2015;108(12):634-642.
158. Zhao ZY and Zhou YM. Circulating miR-21 and miR-423-5p as biomarkers for heart failure in heart valve disease patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(5):5703-5711.
159. Xu T, Zhou Q, Che L, Das S, Wang L, Jiang J, Li G, Xu J, Yao J, Wang H, Dai Y and Xiao J. Circulating miR-21, miR-378, and miR-940 increase in response to an acute exhaustive exercise in chronic heart failure patients. *Oncotarget*. 2016;7(11):12414-12425.
160. Lai KB, Sanderson JE, Izzat MB and Yu CM. Micro-RNA and mRNA myocardial tissue expression in biopsy specimen from patients with heart failure. *Int J Cardiol*. 2015;199:79-83.
161. Rubis P, Toton-Zuranska J, Wisniowska-Smialek S, Holcman K, Kolton-Wroz M, Wolkow P, Wypasek E, Natorska J, Rudnicka-Sosin L, Pawlak A, Kozanecki A and Podolec P. Relations between circulating microRNAs (miR-21, miR-26, miR-29, miR-30 and miR-133a), extracellular matrix fibrosis and serum markers of fibrosis in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2017;231:201-206.
162. Yang H, Yu J, Wang L, Ding D, Zhang L, Chu C, Chen Q, Xu Z, Zou Q and Liu X. miR-320a is an independent prognostic biomarker for invasive breast cancer. *Oncol Lett*. 2014;8(3):1043-1050.
163. Flowers E, Aouizerat BE, Abbasi F, Lamendola C, Grove KM, Fukuoka Y and Reaven GM. Circulating microRNA-320a and microRNA-486 predict thiazolidinedione response: Moving towards precision health for diabetes prevention. *Metabolism*. 2015;64(9):1051-1059.
164. Linnstaedt S, Riker K, Nyland J, Zimny E, Lewandowski C, Hendry P, Damiron K, Pearson C, Velilla M, Jones J, Swor R, Domeier R and McLean S. microRNA 320a is a

- potential mediator of chronic widespread hyperalgesia development after stress exposure. *J Pain*. 2015;16(4):S40.
165. Devaux Y, Mueller M, Haaf P, Goretti E, Twerenbold R, Zangrando J, Vausort M, Reichlin T, Wildi K, Moehring B, Wagner DR and Mueller C. Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain. *J Intern Med*. 2015;277(2):260-271.
 166. Sommariva E, D'Alessandra Y, Farina FM, Casella M, Cattaneo F, Catto V, Chiesa M, Stadiotti I, Brambilla S, Russo AD, Carbucicchio C, Vettor G, Riggio D, Sandri MT, Barbuti A, Vernillo G, Muratori M, Ferro MD, Sinagra G, Moimas S, Giacca M, Colombo GI, Pompilio G and Tondo C. MiR-320a as a potential novel circulating biomarker of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Scientific Reports*. 2017;7(1):4802.
 167. Marques FZ, Vizi D, Khammy O, Mariani JA and Kaye DM. The transcardiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart. *Eur J Heart Fail*. 2016;18(8):1000-1008.
 168. Chen C, Wang Y, Yang SL, Li HP, Zhao G, Wang F, Yang L and Wang DW. MiR-320a contributes to atherogenesis by augmenting multiple risk factors and down-regulating SRF. *J Cell Mol Med*. 2015;19(5):970-985.
 169. Yin ZW, Zhao YR, Li HP, Yan MW, Zhou L, Chen C and Wang DW. miR-320a mediates doxorubicin-induced cardiotoxicity by targeting VEGF signal pathway. *Aging*. 2016;8(1):192-207.
 170. Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS and Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2012;14(2):147-154.
 171. Su R, Lin HS, Zhang XH, Yin XL, Ning HM, Liu B, Zhai PF, Gong JN, Shen C, Song L, Chen J, Wang F, Zhao HL, Ma YN, Yu J and Zhang JW. MiR-181 family: regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia as well as potential therapeutic targets. *Oncogene*. 2015;34(25):3226-3239.
 172. Sun XH, Sit A and Feinberg MW. Role of miR-181 family in regulating vascular inflammation and immunity. *Trends Cardiovas Med*. 2014;24(3):105-112.
 173. Liu G, Li Y and Gao XG. microRNA-181a is upregulated in human atherosclerosis plaques and involves in the oxidative stress-induced endothelial cell dysfunction through direct targeting Bcl-2. *Eur Rev Med Pharmacol*. 2016;20(14):3092-3100.
 174. Jackson KL, Marques FZ, Nguyen-Huu TP, Stevenson ER, Charchar FJ, Davern PJ and Head GA. MicroRNA-181a Mimic Inhibits the Renin-Angiotensin System and Attenuates Hypertension in a Neurogenic Model of Hypertension. *Hypertension*. 2014;64(1):A038.

175. Aranda JF, Canfran-Duque A, Goedeke L, Suarez Y and Fernandez-Hernando C. The miR-199-dynamin regulatory axis controls receptor-mediated endocytosis. *J Cell Sci.* 2015;128(17):3197-3209.
176. Li Z, Liu L, Hou N, Song Y, An X, Zhang Y, Yang X and Wang J. miR-199-sponge transgenic mice develop physiological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2016;110(2):258-267.
177. Chan YC, Roy S, Huang Y, Khanna S and Sen CK. The MicroRNA miR-199a-5p down-regulation switches on wound angiogenesis by derepressing the v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1-Matrix Metalloproteinase-1 pathway. *J Biol Chem.* 2012;287(49):41032-41043.
178. Haghighi A, Missol-Kolka E, Tsikas D, Venturini L, Brundiers S, Castoldi M, Muckenthaler MU, Eder M, Stapel B, Thum T, Haghighi A, Petrasch-Parwez E, Drexler H, Hilfiker-Kleiner D and Scherr M. Signal transducer and activator of transcription 3-mediated regulation of miR-199a-5p links cardiomyocyte and endothelial cell function in the heart: a key role for ubiquitin-conjugating enzymes. *Eur Heart J.* 2011;32(10):1287-1297.
179. Ke QD and Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006;70(5):1469-1480.
180. Rane S, He MZ, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF and Abdellatif M. Downregulation of MiR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1 alpha and sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2009;104(7):879-886.
181. Topkara VK and Mann DL. Role of MicroRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiovasc Drug Ther.* 2011;25(2):171-182.
182. Gu S and Chan WY. Flexible and versatile as a chameleon-sophisticated functions of microRNA-199a. *Int J Mol Sci.* 2012;13(7):8449-8466.
183. Martins PA, Salic K, Gladka MM, Armand AS, Leptidis S, Azzouz H, Hansen A, Coenen-de Roo CJ, Bierhuizen MF, van der Nagel R, van Kuik J, Weger R, Bruin A, Condorelli G, Arbones ML, Eschenhagen T and Windt LJ. MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. *Nat Cell Biol.* 2010;12(12):1220-1227.
184. Schulz RA and Yutzey KE. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev Biol.* 2004;266(1):1-16.

185. Molkentin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res.* 2004;63(3):467-475.
186. Duygu B, Poels EM, Juni R, Bitsch N, Ottaviani L, Olieslagers S, Windt LJ and Costa Martins PA. miR-199b-5p is a regulator of left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Non-coding RNA Research.* 2017;2:18-26.
187. Holmgren G, Synnergren J, Andersson CX, Lindahl A and Sartipy P. MicroRNAs as potential biomarkers for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol in Vitro.* 2016;34:26-34.
188. Kilic S. ROC Analysis in clinical decision making. *JMOOD.* 2013;3(3):135-140.
189. Wong ND. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11(5):276-289.
190. Wentzel JJ, Chatzizisis YS, Gijzen FJH, Giannoglou GD, Feldman CL and Stone PH. Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodelling: current understanding and remaining questions. *Cardiovasc Res.* 2012;96(2):234-243.
191. Hajar R. Risk factors for coronary artery disease: Historical perspectives. *Heart Views.* 2017;18(3):109-114.
192. Miller YI, Chang MK, Binder CJ, Shaw PX and Witztum JL. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(5):437-445.
193. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8):C7-C12.
194. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR and Zornoff LAM. Cardiac remodeling: Concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2016;106(1):62-69.
195. Mythili S and Malathi N. Diagnostic markers of acute myocardial infarction. *Biomed Rep.* 2015;3(6):743-748.
196. Tufekci KU, Oner MG, Meuwissen RL and Genc S. The role of microRNAs in human diseases. *Methods Mol Biol.* 2014;1107:33-50.
197. Pfeffer SR, Yang CH and Pfeffer LM. The Role of miR-21 in cancer. *Drug Develop Res.* 2015;76(6):270-277.
198. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, Wang L, Li Q, Wang N, Shan H, Li Z and Yang B. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(1):73-77.

199. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW and Jing Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*. 2010;31(6):659-666.
200. Tian J, An XJ and Niu L. Role of microRNAs in cardiac development and disease. *Exp Ther Med*. 2017;13(1):3-8.
201. Bialek S, Gorko D, Zajkowska A, Koltowski L, Grabowski M, Stachurska A, Kochman J, Sygitowicz G, Małecki M, Opolski G and Sitkiewicz D. Release kinetics of circulating miRNA-208a in the early phase of myocardial infarction. *Kardiol Pol*. 2015;73(8):613-619.
202. Ling TY, Wang XL, Chai Q, Lu T, Stulak JM, Joyce LD, Daly RC, Greason KL, Wu LQ, Shen WK, Cha YM and Lee HC. Regulation of cardiac CACNB2 by microRNA-499: Potential role in atrial fibrillation. *Bba Clin*. 2017;7:78-84.
203. Feng YH and Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomed Rep*. 2016;5(4):395-402.
204. Yin C, Wang XY and Kukreja RC. Endogenous microRNAs induced by heat-shock reduce myocardial infarction following ischemia-reperfusion in mice. *Febs Lett*. 2008;582(30):4137-4142.
205. Ren J, Zhang J, Xu N, Han G, Geng Q, Song J, Li S, Zhao J and Chen H. Signature of circulating microRNAs as potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease. *Plos One*. 2013;8(12):e80738.
206. Han H, Qu G, Han C, Wang Y, Sun T, Li F, Wang J and Luo S. MiR-34a, miR-21 and miR-23a as potential biomarkers for coronary artery disease: a pilot microarray study and confirmation in a 32 patient cohort. *Exp Mol Med*. 2015;47:e138.
207. Zhang JH, Xing Q, Zhou XH, Li JX, Li YD, Zhang L, Zhou Q and Tang B. Circulating miRNA-21 is a promising biomarker for heart failure. *Mol Med Rep*. 2017;16(5):7766-7774.
208. Zhang Y, Liu YJ, Liu T, Zhang H and Yang SJ. Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. *Eur Rev Med Pharmacol*. 2016;20(2):323-329.
209. Liu J, Li SF, Lee CY, Song JX, Zhang F, Cui YX and Chen H. Circulating microRNAs as potential biomarkers for unstable angina. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(8):9073-9083.
210. Ding G, Huang G, Liu HD, Liang HX, Ni YF, Ding ZH, Ni GY and Hua HW. MiR-199a suppresses the hypoxia-induced proliferation of non-small cell lung cancer cells through targeting HIF1 alpha. *Mol Cell Biochem*. 2013;384(1-2):173-180.

211. Yang XH, Lei SR, Long JH, Liu XJ and Wu QZ. MicroRNA-199a-5p inhibits tumor proliferation in melanoma by mediating HIF-1 alpha. *Mol Med Rep.* 2016;13(6):5241-5247.
212. Jansen F, Yang XY, Proebsting S, Hoelscher M, Przybilla D, Baumann K, Schmitz T, Dolf A, Endl E, Franklin BS, Sinning JM, Vasa-Nicotera M, Nickenig G and Werner N. MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in Patients with coronary artery disease. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(6):e001249.
213. Kuhn C, Frank D, Will R, Jaschinski C, Frauen R, Katus HA and Frey N. DYRK1A is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 2009;284(25):17320-17327.
214. Zhou HJ, Wang LQ, Xu QS, Fan ZX, Zhu Y, Jiang H, Zheng XJ, Ma YH and Zhan RY. Downregulation of miR-199b promotes the acute spinal cord injury through IKK beta-NF-kappa B signaling pathway activating microglial cells. *Exp Cell Res.* 2016;349(1):60-67.
215. Zhu L, Xu H, Lv W, He Z, Ye P, Wang Y and Hu J. miR-199b-5p regulates immune-mediated allograft rejection after lung transplantation through the GSK3 beta and NF-kappa B pathways. *Inflammation.* 2018;41(4):1524-1535.
216. Jantti TAJ, Segersvard H, Lassus JP, Devaux Y, Vausort M, Immonen K, Pulkki K, Tikkanen I, Lakkisto P and Harjola VP. Circulating microRNAs miR-21, miR-122a, miR-320a and miR-423 predict mortality in patients with cardiogenic shock. *Eur Heart J.* 2016;37 Suppl:321.
217. Song CL, Liu B, Diao HY, Shi YF, Zhang JC, Li YX, Liu N, Yu YP, Wang G, Wang JP and Li Q. Down-regulation of microRNA-320 suppresses cardiomyocyte apoptosis and protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by targeting IGF-1. *Oncotarget.* 2016;7(26):39740-39757.
218. Ni CW, Qiu HW and Jo H. MicroRNA-663 upregulated by oscillatory shear stress plays a role in inflammatory response of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(5):H1762-H1769.
219. Cheng ZA, Qiu SB, Jiang L, Zhang AL, Bao WJ, Liu P and Liu J. MiR-320a is downregulated in patients with myasthenia gravis and modulates inflammatory cytokines production by targeting mitogen-activated protein kinase 1. *J Clin Immunol.* 2013;33(3):567-576.

220. Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, Constantine-Paton M and Horvitz HR. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol.* 2004;5(9):R68.
221. Moon JM, Xu LJ and Giffard RG. Inhibition of microRNA-181 reduces forebrain ischemia-induced neuronal loss. *J Cerebr Blood F Met.* 2013;33(12):1976-1982.
222. Jackson KL, Marques FZ, Watson AMD, Palma-Rigo K, Nguyen-Huu TP, Morris BJ, Charchar FJ, Davern PJ and Head GA. A novel interaction between sympathetic overactivity and aberrant regulation of renin by miR-181a in BPH/2J genetically hypertensive mice. *Hypertension.* 2013;62(4):775-781.
223. Xie WD, Li ZX, Li MN, Xu NH and Zhang Y. miR-181a and inflammation: miRNA homeostasis response to inflammatory stimuli in vivo. *Biochem Bioph Res Co.* 2013;430(2):647-652.
224. Hooten NN, Fitzpatrick M, Wood WH, De S, Ejiogu N, Zhang YQ, Mattison JA, Becker KG, Zonderman AB and Evans MK. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging.* 2013;5(10):725-740.

7. EKLER

EK.1. Etik Kurul Kararı

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Koroner Arter Hastalarında Bypass Greft Cerrahisi Öncesi Ve Sonrasında İsklemleri/Reperfüzyon İle İlişkili MikroRNA Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	276

KARAR BİLGİLERİ	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DIĞER:	☐	
	Karar No:2016 /276	Tarih: 17.10.2016	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		
	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

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

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof. Dr.Belgin ALAŞEHİRLİ	FARMAKOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr. Mehmet KESKİN	PEDİATRİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr.Feridun IŞIK	GÖĞÜS CERRAHİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. .Dr. İlker SEÇKİNER	ÜROLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Ramazan BAL	FİZYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. .Dr.Yasemin ZER	MİKROBİYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç. Dr. Zeynel Abidin ÖZTÜRK	İÇ HASTALIKLARI	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr.Seval KUL	BIYOİSTATİSTİK	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Yrd. Doç. Dr Betül TAŞ	AĞIZ DIŞ ve ÇENE CERRAHİSİ	Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Uzm.Dr. Cahide Elif ORHAN	FARMAKOLOJİ	Gaziantep İl Sağlık Müdürlüğü	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Eyüp ÇELİK	AVUKAT	Gaziantep Barosu	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
İrem ELBEYLİ	MİMAR	Gaziantep Büyükşehir Belediyesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ
İmza:

Elder Hasim Aldem
Cimen Kadilli

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

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Koroner Arter Hastalarında Bypass Greft Cerrahisi Öncesi Ve Sonrasında İsklemleri/Reperfüzyon İle İlişkili MikroRNA Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	276

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimler Fakültesi 2. Kat Şehitkamil/Gaziantep
	TELEFON	0342 360 07 53 / 77704
	FAKS	0342 360 39 27
	E-POSTA	gaunetikkurul@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ

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

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
EKLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı		Açıklama			
	SIGORTA	☐				

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ
İmza:

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

ÖZGEÇMİŞ

10 Şubat 1988 yılında Gaziantep’de doğdu. İlköğretimi, Kenan Evren İlköğretim okulunda, Ortaöğrenimi Yüzüncü Yıl ilköğretim okulunda ve lise öğrenimini Fitnat-Nuri Tekerekoğlu Anadolu lisesinde tamamladı. 2012 yılında Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldu. 2012 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’nda doktora başladı.

