



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENİSTITÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**FARKLI VÜCUT SIVILARINDA SİRKÜLE MİRNA EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN ANEVRİZMA PROGNOZUNA ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

SARA KHADEM ANSARI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

Eskişehir, 2023



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENİSTITÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**FARKLI VÜCUT SIVILARINDA SİRKÜLE MİRNA EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN ANEVİRİZMA PROGNOZUNA ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

SARA KHADEM ANSARI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

Eskişehir, 2023

ÖZET

Başlık: Farklı vücut sıvılarında sirküle miRNA ekspresyon profillerinin anevrizma prognozuna etkisinin değerlendirilmesi.

Amaç: Bu çalışmada, sirküle miR-29a, miR-126, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-1297, miR-27b-3p ve miR-502-5p'nin ekspresyon seviyeleri incelenerek, hasta ve kontrol bireylerindeki ekspresyon profillerinin karşılaştırılması, rüptüre ve rüptüre olmayan olgulardaki miRNA durumunun saptanması, olgularda bu miRNA'ların prognostik öneminin değerlendirilmesi, kanın non-invaziv yaklaşım için kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

Yöntem: İA tanısı alan 12 SAK geçiren olgunun beşinci gününde alınan kan ve BOS'u, 12 SAK geçirmeyen olgunun kanı ve 14 kontrol bireyin kan ve BOS örnekleri incelenmiştir. Real-Time PCR yöntemi ile sekiz sirküle miRNA'nın ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Bulgular: SAK geçiren hasta ile kontrol grubu bireylerin kan örneklerinin karşılaştırılmasında, miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-1297, miR-502-5p ve BOS örneklerinin karşılaştırılmasında, miR-126, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-29a ve miR-27b-3p'nin anlamlı farklılıkları gözlenmiştir. SAK geçiren ve geçirmeyen hastaların kan örneklerinin karşılaştırılmasında miR-126, miR-200a-3p, miR-451a ve miR-502-5p ekspresyonları açısından anlamlı farklılıklar saptanmıştır. aSAK hastaların kan örneklerinde modifiye rankin skalası karşılaştırıldığında, miR-451a'nın ekspresyonu önemli derecede anlamlı bulunmuştur. SAK geçiren vakaların kan ve BOS örneklerinin karşılaştırılmasında miR-126, miR-29a, miR-146a-5p ve miR-27b-3p'nin anlamlı farklılıkları saptanmıştır.

Sonuç: Kan-BOS miRNA karşılaştırmasında, İA hastaların kan örneklerinde sirküle miRNA'ların ekspresyon farklılığının saptanması ve hasta ile kontrol gruplarının ayırt etme güçlerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu da hastalığın prognozunda potansiyel bir non-invaziv biyomarker olarak kullanılabileceklerini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: İntrakranial anevrizma, Subaraknoid kanama, Sirküle miRNA, Biyomarker

ABSTRACT

Title: Evaluation of the role of circulating miRNAs expression profiles in different biofluids in aneurysm prognosis.

Aim: In this study, it is aimed to compare the expression profiles of circulating miR-29a, miR-126, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-1297, miR-27b-3p and miR-502-5p between patients and controls, determine the differences in miRNA expressions in ruptured and unruptured cases, blood-CSF miRNA comparison and evaluate the usability of blood for non-invasive approach.

Methods: Blood and CSF collected on day 5 after the onset of subarachnoid hemorrhage from 12 patients with IA, blood from 12 patients without SAH, CSF and blood specimens from 14 persons who had no neurological disease. Expression levels of miRNAs were examined by using the RT-PCR method.

Results: Comparing the blood samples of patients with SAH and control groups, significant difference were found in miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-1297 and miR-502-5p. Comparing CSF samples of patients with SAH and control group, significant differences were observed in miR-126, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-29a and miR-27b-3p. Comparison of blood samples from patients with ruptured and unruptured IA revealed significant differences in miR-126, miR-200a-3p, miR-451a and miR-502-3p expressions. Comparing the mRS in blood samples of patients with aSAH, the expression of miR-451a was found to be significantly different. MiR-126, miR-29a, miR-146a-5p and miR-27b-3p were found to be significantly different in comparison of blood and CSF samples of cases with SAH.

Conclusions: In the blood-CSF miRNA comparison, it was observed that the expression differences of circulating miRNAs were detected in the blood samples of IA patients and their power to distinguish between the patient and control groups showed high sensitivity and specificity. This suggests that they can be used as a potential non-invasive biomarker in the prognosis of the disease.

Key words: Intracranial aneurysm, Subarachnoid hemorrhage, Circulating miRNA, Biomarker

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO DİZİNİ.....	vii
ŞEKİL DİZİNİ.....	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanamamış İntrakranial Anevrizma	4
2.1.1. Yapısal değişiklikler ve hemodinamik.....	5
2.2. İntrakranial Anevrizma Büyümesi ve Kanama Riski.....	6
2.3. Anevrizmal Subaraknoid Kanama	7
2.3.1. Subaraknoid kanamanın olası komplikasyonları	8
2.3.2. Anevrizmal subaraknoid kanama değerlendirme skorları.....	9
2.4. Kodlamayan RNA	12
2.5. MikroRNA	12
2.5.1. MiRNA'nın genomik organizasyonu.....	12
2.5.2. MiRNA biyogenezi ve fonksiyonu	13
2.6. Sirküle miRNA'lar	15
2.6.1. Bioyarker olarak sirküle miRNA'lar	16
2.6.2. Kanamış ve kanamamış intrakranial anevrizma patogenezinde sirküle miRNA'lar	16
2.7. MiRNA Ekspresyon Profilleri ve İntrakranial Anevrizma Oluşumunun Mekanizmaları	17
2.7.1. Endotel disfonksiyonu.....	18

2.7.2. Vasküler düz kas hücreleri ve hücre dışı matrisi	19
2.7.3. İnflamasyonun mediyatörleri olan kodlamayan RNA'lar	20
2.8. İntrakranial Anevrizmalarda Önemli Bir Patolojik Süreci Olan İnflamasyon	21
2.9. Hsa-miR-29a	24
2.10. Hsa-miR-126.....	25
2.11. Hsa-miR-200a-3p	28
2.12. Hsa-miR-451a	29
2.13. Hsa-miR-146a-5p	30
2.14. Hsa-miR-1297	32
2.15. Hsa-miR-27b-3p.....	32
2.16. Hsa-miR-502-5p.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	35
3.1. Araştırma Grubu	35
3.2. Gereçler	37
3.2.1. Kullanılan aletler	37
3.2.2. Kullanılan malzemeler	38
3.2.3. Kullanılan primerler.....	38
3.3. Yöntem	39
3.3.1. Materyal alımı	39
3.3.2. Periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonu	39
3.3.3. BOS örneklerinden total RNA izolasyonu	41
3.3.4. cDNA sentezi.....	42
3.3.5. Ekspresyon analizi	43
3.4. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
4.1. Subaraknoid Kanama Geçiren Olgu Grubuna Ait Klinik Özellikler	46

4.2. Subaraknoid Kanama Geçirmeyen Olgu Grubuna Ait Klinik Özellikler.....	48
4.3. Kontrol Periferik Kan Grubuna Ait Bilgiler	49
4.4. Kontrol BOS Grubuna Ait Bilgiler	50
4.5. MiRNA Ekspresyon Analizine Ait Bulgular	51
4.5.1. Subaraknoid kanama geçiren ve geçirmeyen vakalarda yaş ve cinsiyetler arasında miRNA ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması.....	53
4.5.2. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubu bireylerinin periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması	53
4.5.3. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubunun BOS'ta miRNA ekspresyon karşılaştırılması.....	58
4.5.4. SAK geçiren ve SAK geçirmeyen hastaların periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon profillerinin karşılaştırılması	63
4.5.5. Subaraknoid kanama geçiren vakaların kan ve BOS örneklerinde miRNA ekspresyon karşılaştırılması.....	68
4.5.6. Subaraknoid kanama geçirmeyen hastalar ve kontrol grubunun periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon karşılaştırılması.....	73
4.5.7. Subaraknoid kanama geçiren vakaların kan örneklerinde miRNA ekspresyon profillerinin olgu klinik özellikleri (Fisher skoru, Hunt-Hess skoru ve modifiye rankın skalası) ile karşılaştırılması.....	74
5. TARTIŞMA	80
5.1. MiR-126 Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi	82
5.2. MiR-29a Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi	88
5.3. MiR-200a-3p Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi	93
5.4. MiR-451a Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi.....	95
5.5. MiR-146a-5p Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi	101
5.6. MiR-1297 Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi	104

5.7. miR-27b-3p Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi.....	108
5.8. MiR-502-5p Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi	110
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	113
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	117
8. EKLER DİZİNİ	Error! Bookmark not defined.
EK-1. Etik Kurul Onayı	
EK-2. Turnitin Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.
10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	Error! Bookmark not defined.

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. Subaraknoid kanamanın olası komplikasyonları.....	9
Tablo 2.2. Hunt-Hess skoru.....	10
Tablo 2.3. WFNS skoru.....	10
Tablo 2.4. Fisher skoru.....	11
Tablo 2.5. Modifiye rankın skalası.....	11
Tablo 2.6. MiR-29a ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yolaklar.....	25
Tablo 2.7. MiR-126 ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yolaklar.....	28
Tablo 2.8. MiR-200a-3p ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yolaklar.....	29
Tablo 2.9. 451a ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yolaklar.....	30
Tablo 2.10. MiR-146a-5p ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yolaklar.....	31
Tablo 2.11. MiR-1297 ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yolaklar.....	32
Tablo 2.12. MiR-27b-3p ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yolaklar.....	33
Tablo 2.13. MiR-502-5p ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yolaklar.....	34
Tablo 3.1. cDNA sentez PCR koşulları.....	43
Tablo 3.2. Kullanılan primer dizileri.....	44
Tablo 3.3. Real-Time PCR reaksiyonkurulum bileşenleri.....	44
Tablo 3.4. RT-PCR protokolü.....	45
Tablo 4.1. SAK geçiren olgu grubuna ait klinik özellikler.....	47
Tablo 4.2. Hafif ve şiddetli SAK geçiren hastaların klinik bilgileri.....	48
Tablo 4.3. SAK geçirmeyen olgu grubuna ait klinik özellikler.....	49
Tablo 4.4. Kontrol periferik kan grubuna ait bilgiler.....	50
Tablo 4.5. Kontrol BOS grubuna ait bilgiler.....	50
Tablo 4.6. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubunun periferik kanda miRNA ekspresyon karşılaştırılması.....	54

Tablo 4.7. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubu bireylerinin	
periferik kanda incelenen sirküle miRNA'ların ROC ve AUC değerleri.....	57
Tablo 4.8. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubunun	
BOS'ta miRNA ekspresyon karşılaştırılması.....	59
Tablo 4.9. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubunun	
BOS'ta incelenen sirküle miRNA'ların ROC ve AUC değerleri.....	62
Tablo 4.10. SAK geçiren ve SAK geçirmeyen hastaların periferik kan	
örneklerinde miRNA ekspresyon karşılaştırılması.....	64
Tablo 4.11. SAK geçiren ve SAK geçirmeyen hastaların periferik kan	
örneklerinde incelenen sirküle miRNA'ların ROC ve AUC değerleri.....	67
Tablo 4.12. SAK geçiren vakaların kan ve BOS örneklerinde miRNA ekspresyon	
karşılaştırılması.....	69
Tablo 4.13. SAK geçiren vakaların kan ve BOS örneklerinde incelenen	
sirküle miRNA'ların ROC ve AUC değerleri.....	72
Tablo 4.14. Subaraknoid kanama geçirmeyen hastalar ve kontrol grubunun	
periferik kanda miRNA ekspresyon karşılaştırılması.....	74
Tablo 4.15. SAK geçiren vakaların kan örneklerinde miRNA ekspresyon	
profilinin modifiye rankın skalası ile karşılaştırılması.....	76
Tablo 4.16. SAK geçiren vakaların kan örneklerinde modifiye rankın	
skalası grupları arasında incelenen sirküle miRNA'ların ROC	
ve AUC değerleri.....	78
Tablo 5.1. Hsa-miR-126-3p'nin hedeflediği bazı genler ve ilgili yolları.....	86
Tablo 5.2. MiR-126 ile ilişkili çalışmalar.....	87
Tablo 5.3. Hsa-miR-29a-3p'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolları.....	91
Tablo 5.4. MiR-29a ile ilişkili çalışmalar.....	92

Tablo 5.5. Hsa-miR-200a-3p'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolakları.....	94
Tablo 5.6. MiR-200a-3p ile ilişkili çalışmalar.....	95
Tablo 5.7. Hsa-miR-451a'nın hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolakları.....	99
Tablo 5.8. MiR-451a ile ilişkili çalışmalar.....	100
Tablo 5.9. Hsa-miR-146a-5p'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolakları.....	103
Tablo 5.10. MiR-146a-5p ile ilişkili çalışmalar.....	104
Tablo 5.11. Hsa-miR-1297'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolakları.....	107
Tablo 5.12. MiR-1297 ile ilişkili çalışmalar.....	107
Tablo 5.13. Hsa-miR-27b-3p'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolakları.....	109
Tablo 5.14. MiR-27b-3p ile ilişkili çalışmalar.....	110
Tablo 5.15. Hsa-miR-502-5p'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolakları.....	112
Tablo 5.16. MiR-502-5p ile ilişkili çalışmalar.....	112

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Sakküler intrakranial anevrizmaların yaygın oluşum lokasyonları.....	5
Şekil 2.2. Kanamamış İA'nın zaman içinde oluşumu ve potansiyel ilerlemesi.....	7
Şekil 2.3. MiRNA'ların genomik yerleşimleri.....	14
Şekil 2.4. MiRNA biyogenezi.....	15
Şekil 2.5. Vasküler sisteminde anevrizma patogenezinde yer alan dört kompartman.....	18
Şekil 2.6. İntrakranial anevrizma oluşumu ve ilerlemesinde inflamasyon mekanizması.....	23
Şekil 2.7. MiR-29 tarafından hedeflenen bir kaç hücresel süreç ve genleri.....	24
Şekil 2.8. miR-126'nın vasküloprotektif ve anti-aterojenik rolü.....	27
Şekil 2.9. miR-146a.....	31
Şekil 4.1. U6 (kontrol) genine ait amplifikasyon görüntüsü.....	51
Şekil 4.2. MiRNA ekspresyonların amplifikasyonu 1.....	52
Şekil 4.3. miRNA ekspresyonların amplifikasyonu 2.....	52
Şekil 4.4. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubu bireylerinin periferik kan örneklerinde ekspresyon seviyeleri.....	55
Şekil 4.5. SAK geçiren hastalar ve kontrol grubu bireylerinin periferik kan örneklerindeki miRNA ekspresyonunun heatmap'i ve hiyerarşik kümelemesi.....	56
Şekil 4.6. SAK geçiren hastaların ve kontrol grubu bireylerin periferik kan örneklerinde miRNA ROC eğrileri.....	57
Şekil 4.7. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubunun BOS'ta seviyeleri.....	60

Şekil 4.8. SAK geçiren hastalar ve kontrol gurubu bireylerinin BOS örneklerindeki miRNA ekspresyonunun heatmap'i ve hiyerarşik kümelemesi.....	61
Şekil 4.9. SAK geçiren hastaların ve kontrollerin BOS gurubundaki miRNA ROC eğrileri.....	62
Şekil 4.10. Subaraknoid kanama geçiren (SAK+) ve geçirmeyen (SAK-) gruplar arasındaki ekspresyon seviyeleri.....	65
Şekil 4.11. SAK geçiren, SAK geçirmeyen ve kontrol gurubu bireylerinin periferik kan örneklerindeki miRNA ekspresyonunun heatmap'i ve hiyerarşik kümelemesi.....	66
Şekil 4.12. SAK geçiren ve SAK geçirmeyen hastaların periferik kan örneklerinde miRNA ROC eğrileri.....	67
Şekil 4.13. Subaraknoid kanama geçiren hastaların kan ve BOS grubu arasındaki ekspresyon seviyeleri.....	70
Şekil 4.14. SAK geçiren hastaların kan ve BOS grubunda miRNA ekspresyonunun heatmap'i ve hiyerarşik kümelemesi.....	71
Şekil 4.15. SAK geçiren vakaların kan ve BOS örneklerinde miRNA ROC eğrileri.....	72
Şekil 4.16. Subaraknoid kanama geçiren hastaların kan grubunda modifiye rankın skalaları arasındaki ekspresyon seviyeleri.....	77
Şekil 4.17. SAK geçiren vakaların kan örneklerinde modifiye rankın skalası grupları arasında miRNA ROC eğrileri.....	78

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAA	: Abdominal Aort Anevrizmal
Acom	: Anterior komünikan arter
AGO	: Argonaute
ASA	: Anterior serebral arter
aSAK	: Anevrizmal subaraknoid kanama
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
COX-2	: Siklooksijenaz-2
Ct	: Döngü eşiği
DGCR8	: DiGeorge sendromu kritik bölge 8
ECM	: Hücre dışı matriks
GKS	: Glaskow Koma Skalası
İA	: İntrakranial anevrizma
ICAM-1	: İntrasellüler adezyon molekülü-1
İKA	: İnternal karotid arter
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
IL6	: İnterlökin-6
KİA	: Kanamamış intrakranial anevrizma
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein-1
miRNA	: MikroRNA
ml	: Mililitre
μl	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
MMP	: Matriks metalloproteinaz
mRS	: Modifiye Rankin Skalası

ng	: Nano gram
ncRNA	: Kodlamayan RNA
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
OSA	: Orta serebral arter
Pcom	: Posterior komünikan arter
PGE2	: Prostaglandin E2
RISC	: RNA ile indüklenen susturma kompleksi
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAK	: Subaraknoid kanama
SDF-1	: Stromal hücre kaynaklı faktör-1
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü-alfa
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VDKH	: Vasküler düz kas hücreleri
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörüne
WFNS	: World Federation of Neurosurgical Societies

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanamamış intrakranial anevrizmalar (KİA), genellikle intrakranial arterin bir dalında bulunan balon şeklinde patolojik genişlemelerdir (Bakker et al., 2020). KİA'ların %85-90'ı sakkülerdir ve tipik olarak Willis poligonundaki arteriyel bifurkasyonlarında meydana gelir (Zhou et al., 2018). KİA'nın genel popülasyondaki prevalansı %2-5 dolaylarındadır ve genellikle asemptomatik olarak kalırlar (Gareev et al., 2021). Anevrizmalar en sık 40-60 yaşlar arasında görülür (Etminan & Rinkel, 2016). Anevrizmanın büyümesinin yüksek kan basıncı, hemodinamik stres ve inflamasyon ile ilişkili olduğu görülmektedir (Thompson et al., 2015). Anevrizmanın büyümesi ve kanamasında rol oynayan risk faktörleri yaş, kadın cinsiyet, hipertansiyon, sigara, alkol kullanımı, coğrafi bölge gibi hastaya özgü faktörler hem de posterior dolaşımda yer alması, düzensiz şekil yapısı ve büyük anevrizma boyutu gibi anevrizmaya özgü faktörleri içermektedir (Tawak et al., 2021).

Subaraknoid kanama (SAK) santral sinir sisteminde normalde beyin omurilik sıvısı (BOS) ile dolu olan subaraknoid mesafe içine damar içindeki kanın ekstrevasyasyonudur (Mijiti et al., 2016). Travmaya bağlı olmayan subaraknoid kanamanın en sık gözlenen nedeni, %85 oranında intrakranial anevrizmanın kanamasıdır (Zhou et al., 2018). Anevrizmal subaraknoid kanamanın (aSAK) insidansı 100.000'de 6-16 kişi olup %45 oranında mortaliteye sahiptir (N. Lai et al., 2020). aSAK tüm inmelere %5'ini oluşturur. Nispeten nadir olmasına rağmen yıkıcı etkileri nedeniyle major etkiye sahiptir. Hastaların üçte biri ölür ve üçte biri yardıma mühtaç kalmaktadır (Bakker & Ruigrok, 2021).

MikroRNA (miRNA), gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde kritik rol oynayan küçük (18-22 nükleotid) protein kodlamayan RNA'lardır. MiRNA'ların hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre farklılaşması gibi birçok biyolojik süreci düzenleme potansiyeli bulunmaktadır (Gareev et al., 2021). Çoğu miRNA'lar hücrelerde eksprese olurlar. Bununla birlikte, hücre dışı serum, plazma, BOS, tükürük ve süt gibi insan vücudunun birçok biyolojik sıvısında da, sirküle miRNA'lar olarak adlandırılan çok sayıda miRNA bulunmuştur. Apoptoz veya nekroza bağlı olarak hasar görmüş hücrelerden pasif salgılama; hücre dışı kesecikler (EV) kullanılarak aktif salgılama veya RNA'ya bağlanan proteine bağımlı bir yol kullanılarak aktif sekresyon gibi olaylara bağlı olarak sirküle miRNA'lar vücut sıvılarında üretilirler veya salgılanırlar. Sirküle

miRNA'ların nükleazlara dirençli olma özelliklerinden dolayı ideal tanı ve prognostik biyomarker potansiyelleri bulunmaktadır (Kamal & Shahidan, 2020). Dolaşımdaki miRNA'ların ekspresyon profili değişimleri, kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere pek çok hastalıkta bildirilmiştir. Belirli sirküle miRNA'ların ekspresyon profillerindeki değişikliklerin yüksek kanama riskiyle ilişkili olabileceği ve ayrıca hastalığın gelişiminin erken evrelerinde saptanabileceği bildirilmiştir. İnme ve alt tiplerinin daha hızlı ve doğru tanısı için umut verici bir biyomarker olabileceği belirtilmiştir. Sirküle miRNA'lar rüptüre ve rüptüre olmayan İA'ların tanı ve prognozunda daha hassas ve doğru olmalarına karşın, invazif olmayan biyomarker olarak daha az çalışılmıştır ve İA'ların oluşumu, ilerlemesi ve kanamasını tahmin edebilecek hiçbir bağımsız biyomarker bulunmamıştır. Bugüne kadar İA'lar için çeşitli immünolojik, genetik, inflamatuvar biyobelirteçlerin yanı sıra anjiyogenez veya hücre adezyonu ile ilişkili faktörleri içeren çalışmalarda İA'ların oluşumunu, ilerlemesini ve yırtılmasını bağımsız olarak tahmin edebilecek biyobelirteçler saptanmamıştır. Ancak rüptüre olan ve rüptüre olmayan İA'ların tanı ve prognozunda daha hassas ve doğru bilgi verme potansiyeli olan non-invaziv sirküle miRNA'ların biyobelirteç olarak değerlendirildiği çalışmalar çok sınırlıdır (Gareev et al., 2021).

Çalışmamızın hipotezi, intrakranial anevrizma tanısı alan SAK geçiren olgularda SAK geçirmeyen olgulara göre sirküle miRNA ekspresyonlarında farklılık olacağı yönündedir. Ayrıca BOS, hedef patoloji bölgesinin ekstrasellüler boşluğu ile doğrudan temas halinde olmasından dolayı kan, serum veya plazmaya göre biyomarker saptanmasında daha avantajlıdır. Bu hipotezler doğrultusunda çalışmada; sirküle miRNA'ların hasta ve kontrol bireylerindeki ekspresyon profillerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması, hastalığa özgü miRNA'ların rüptüre olan ve rüptüre olmayan olgulardaki durumunun saptanması, olgularda bu miRNA'ların prognostik öneminin değerlendirilmesi, kan-BOS miRNA karşılaştırması ile kanın non-invaziv yaklaşım için kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi hedeflenmektedir. Çalışma elde edilen veriler doğrultusunda miRNA hedefleri olan genler ve ilgili yolların belirlenmesine, yollarda yer alan genlerin değerlendirilmesine yönelik yeni projelere zemin oluşturma potansiyeli taşımaktadır.

Bu çalışmada İA tanı ve prognozunda etkili sirküle miRNA biyomarker'larını belirlemek amacıyla literatürde yapılan ilgili çalışmalar taranarak, aday sirküle miRNA'lar seçilmiştir. Bu sirküle miRNA'lar; miR-29a, miR-126, miR-200a-3p, miR-451a, miR-

146a-5p, miR-1297, miR-27b-3p ve miR-502-5p olarak belirlenmiştir. Çalışmada İA tanısı alan 12 SAK geçiren olgunun beşinci gününde alınan periferik kan ve BOS'u, 12 SAK geçirmeyen olgunun kanı ve nörolojik olarak patolojik bir bulgusu olmayan 14 kontrol bireyin (toplam 50 örnek) kan ve BOS örnekleri incelenmiştir. Her bir örnekten total RNA izolasyonu yapılarak, cDNA eldesinden sonra Real-Time PCR yöntemi kullanılarak belirlenen sekiz aday sirküle miRNA'nın ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Olgu ve kontrol grubu bireylerinde, aday sirküle miRNA'lar ekspresyon seviyesi açısından analiz edilmiş olup, İA'da non-invaziv prognostik biyomarker olarak kullanma olasılıkları değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

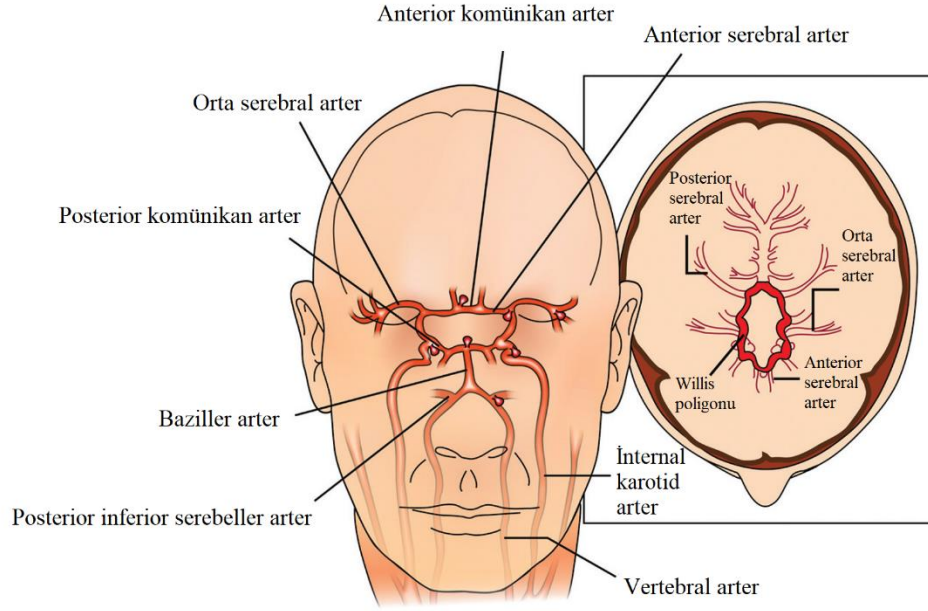
2.1. Kanamamış İntrakranial Anevrizma

Kanamamış intrakranial anevrizmalar (KİA), genellikle intrakranial arterin bir dalında bulunan balon şeklinde patolojik genişlemelerdir (Bakker et al., 2020). Bu genişlemeler boyut olarak değişir (küçük anevrizmalar, <5 mm; orta anevrizmalar, 6-25 mm; büyük anevrizmalar, >25 mm) ve şekillerine göre sınıflandırılır. Bu şekiller sakküler (kese şeklinde) ve fusiform (damar duvarında düz genişleme) olarak adlandırılır. KİA'ların %85-90'ı sakkülerdir ve tipik olarak Willis poligonundaki arteriyel bifurkasyonlarında meydana gelir (Zhou et al., 2018). KİA'nın genel popülasyondaki prevalansı %2-5 dolaylarındadır (Gareev et al., 2021). Anevrizmalar en sık 40-60 yaşlar arasında görülür. KİA'lı hastaların %20-30'unda birden fazla anevrizma gelişebilir (Etminan & Rinkel, 2016).

İntrakranial anevrizmalar (İA) genellikle anterior sirkülasyonda oluşur. Anterior dolaşımda İA'lar en sık, anterior komünikan arter (Acom) ile anterior serebral arter (ASA) arasındaki birleşme yerinde, internal karotid arter (İKA) ile posterior komünikan arter (Pcom) arasındaki birleşme yerinde ve orta serebral arter (OSA) bifurkasyonunda görülür. Posterior dolaşım anevrizmaları, en sık baziller arterin tepesinde görülür (Mehta et al., 2021). Posterior dolaşımdaki anevrizmalar daha az yaygın olmalarına rağmen, kanama, kognitif yetersizlik ve ani ölüm dahil olmak üzere kötü sonuçlara yol açma olasılıkları daha yüksektir (Tawak et al., 2021). Sakküler İA'ların yaygın oluşum lokasyonları Şekil 2.1.'de gösterilmektedir (Brown & Broderick, 2014).

KİA'lar genellikle asemptomatik olarak kalırlar. Semptomatik KİA'ların çoğu kitle etkisi nedeniyle tanı alırlar ve baş ağrısı, kranial nöropati, nöbetler, görme bozuklukları, piramidal yol belirtileri ve yüz ağrısı ile kendilerini gösterebilirler (Toth & Cerejo, 2018). KİA'lar kranial sinirlerin lokal sıkışması veya kanaması ile yaşamı tehdit eden subaraknoid kanamaya (SAK) yol açabilirler (Etminan et al., 2020). Bilgisayarlı tomografik anjiyografik ve manyetik rezonans anjiyografi dahil olmak üzere invaziv olmayan modalitelerdeki gelişmelerle birlikte, KİA'ların tespiti önemli ölçüde artmıştır (Tawak et al., 2021). Ancak anevrizmaların yöntemi, müdahale kararı, doğal komplikasyon riskleri olan

tedaviler (endovasküler veya cerrahi anevrizma onarımı) gibi yeterli klinik yöntemin seçimi hastalar ve klinisyenler için zor olmuştur (Mehta et al., 2021).



Şekil 2.9. Sakküler intrakranial anevrizmaların yaygın oluşum lokasyonları (Brown & Broderick, 2014)

Normal intrakranial arterler, intima (bazal membran ve endotel hücreleri), media (düz kas hücreleri ve elastin lifleri) ve adventisyadan (damar duvarının bütünlüğünü sağlayan kollajen) oluşur. İA'nın patogenezi hala net olarak bilinmemekle birlikte hemodinamik stres ve inflamatuvar yanıt tarafından tetikleyen uyumsuz vasküler yeniden şekillenme kaynaklı olduğu düşünülmektedir ki bu durum damar duvarını zayıflatarak İA'ların oluşumuna yol açmaktadır (Zhou et al., 2018).

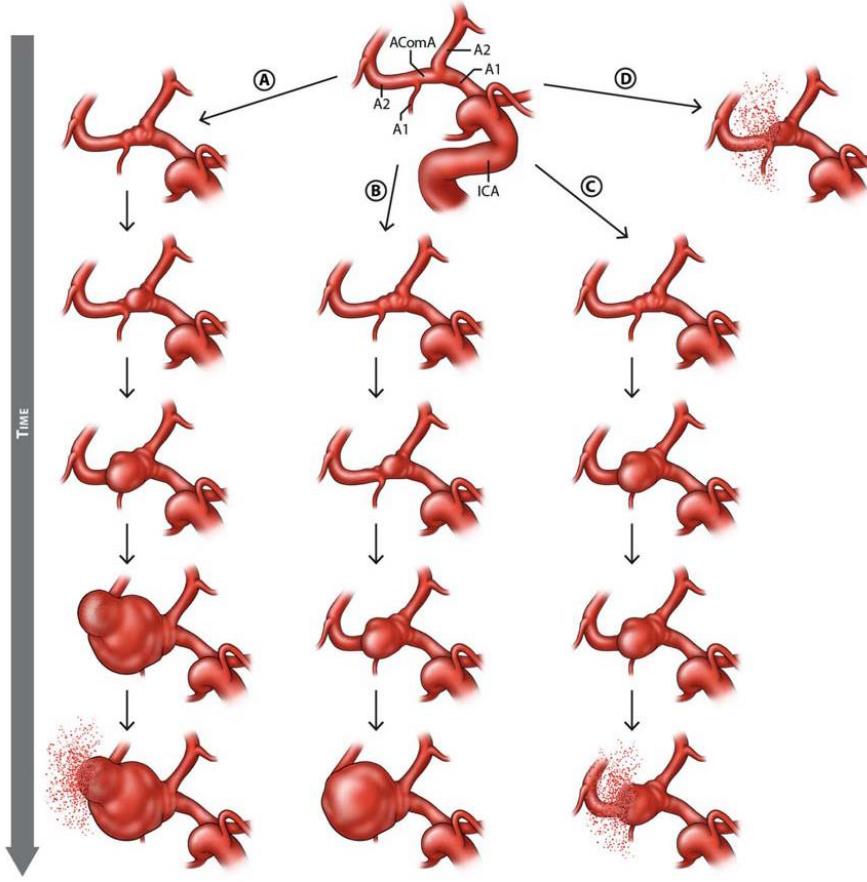
2.1.1. Yapısal değişiklikler ve hemodinamik

Serebral arterlerin duvarları, seyrek tunika adventisya ve daha düşük oranda elastik liflerden oluşur. Bu nedenle ekstrakranial arterlerin duvarlarından yapısal olarak farklıdırlar. Ayrıca serebral arterler, bağ dokusundan ziyade subaraknoid boşluktaki beyin omurilik sıvısına dalarlar ki bu yapısal faktörlerin, serebral arterleri anevrizma oluşumuna duyarlı hale getirdikleri düşünülmektedir. Sağlıklı bir serebral arter duvarındaki iç lamina, arteriyel çatallanmada damar duvarının elastikiyetini ve bütünlüğünü korur. Bir

çatallanmadaki iç elastik laminanın dejenerasyonu veya bozulması, İA oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Dejenerasyonun kesin nedeni ve neden sadece belirli bireylerde ortaya çıktığı bilinmemektedir. Willis poligonundaki anatomik varyasyonların İA oluşumunda önemli faktörler olduğu düşünülmektedir. Çalışmalarda; hipoplastik dallanan arterleri içeren çatallanmaların veya özellikle keskin açılara sahip çatallanmaların anevriza oluşumu için risk faktörler oldukları, bu artmış risk anatomik varyasyondan kaynaklandığı ve hemodinamik kan akış koşullarının değişimine neden olduğu bildirilmiştir (Etminan & Rinkel, 2016)

2.2. İntrakranial Anevrizma Büyümesi ve Kanama Riski

Anevrizmanın büyümesi, yüksek kan basıncı, hemodinamik stres ve inflamasyon ile ilişkili görünmektedir (Thompson et al., 2015). Yıllık *de novo* anevrizma oluşum oranı %0.3-1.8 arasında değişirken, anevrizmal büyüme insidansı %1.51-22.7 arasında değişmektedir (Tawk et al., 2021). KİA'lar hızlı büyüme dönemlerine girmeden önce uzun süre stabil kalabilirler. Büyüme dönemlerinde kanama ve buna bağlı SAK daha olasıdır (Mehta et al., 2021). İA'nın potansiyal ilerlemesi Şekil 2.2.'de gösterilmektedir. Anevrizmanın büyümesi ve kanaması için çeşitli risk faktörler tanımlanmıştır. Bu faktörler yaş, kadın cinsiyet, hipertansiyon, sigara, alkol kullanımı, coğrafi bölge gibi hastaya özgü faktörler ve posterior dolaşımında yer alması, düzensiz şekil yapısı ve büyük anevrizma boyutu dahil olmak üzere anevrizmaya özgü faktörlerde olabilir. Ailede İA öyküsü bulunması genetiğin önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Anevrizmal subaraknoid kanama (aSAK) öyküsü olan kişiler başka bir anevrizma kanaması için daha yüksek risk altındadırlar. İKA ve baziller arter anevrizmalardaki büyüme riski diğer dolaşım anevrizmalarına göre daha yüksektir. Birden fazla anevrizmanın varlığı da anevrizmal büyüme ve kanama ile ilişkilidir (Etminan & Rinkel, 2016; Tawk et al., 2021).



Şekil 10.2. Kanamamış İA'nın zaman içinde oluşumu ve potansiyel ilerlemesi. A1 segmentinin tek taraflı hipoplazisi durumunda Acom kompleksinin anevrizma örneği: A) Kanamaya yol açan anevrizma oluşumu ve ilerleyici büyümesi B) Takip döneminde kanama olmadan, anevrizma oluşumu ve ilerleyici büyümesi C) Kanamadan önce herhangi bir büyüme olmadan anevrizma oluşumu ve kanaması D) Yakın zamanda oluşmuş, çok küçük *de novo* anevrizmanın kanaması (Etminan et al., 2020)

2.3. Anevrizmal Subaraknoid Kanama

Subaraknoid kanama (SAK) santral sinir sisteminde normalde beyin omurilik sıvısı (BOS) ile dolu olan subaraknoid mesafe içine damar içindeki kanın ekstrasvazasyonudur (Mijiti et al., 2016). Travmaya bağlı olmayan subaraknoid kanamanın en sık gözlenen nedeni, %85 sıklıkla intrakranial anevrizmanın kanamasıdır (Zhou et al., 2018). Anevrizmal subaraknoid kanamanın insidansı 100.000'de 6-16 kişi olup %45 oranında mortaliteye sahiptir. (N. Lai et al., 2020). Finlandiya ve Japonya popülasyonlarında aSAK

insidansı daha yüksektir (Toth & Cerejo, 2018). aSAK tüm inmelerin %5'ini oluşturur. Nispeten nadir olmasına rağmen yıkıcı etkileri nedeniyle major etkiye sahiptir. Hastaların üçte biri ölür ve üçte biri yardıma mühtaç kalmaktadır (Bakker & Ruigrok, 2021). aSAK'ta en sık görülen klinik semptomlar, genellikle şimdiye kadar bildirilen ani başlayan şiddetli baş ağrısıdır. Diğer semptomlar bulantı ve kusma, bilinç kaybı, meningismus, fokal defisit ve fotofobidir (Rouanet & Silva, 2019).

2.3.1. Subaraknoid kanamanın olası komplikasyonları

Vazospazm veya serebral arterlerin anjiyografik olarak görülebilen daralması, subaraknoid kanamadan sonra sık görülen bir komplikasyondur ve hastaların %40'ında görülür. Anevrizma kanamasından yaklaşık 7-10 gün sonra pik yapar. Vazospazm semptomatik veya asemptomatik olabilir ve inme dahil gecikmiş serebral iskemik komplikasyonlara yol açabilir. Kalsiyum kanal blokörü tedavisinin, hastaların nörolojik kliniğini düzelttiğini ancak anjiyografik damar daralması ve mortalite komplikasyonlarında etkili olmadığı bildirilmiştir. SAK'ın diğer olası ve ciddi komplikasyonları arasında kardiyak aritmiler, pulmoner ödem, hidrosefali, nöbetler ve Tablo 2.1.'de listelendiği gibi diğer komplikasyonlar yer almaktadır (Toth & Cerejo, 2018).

Tablo 2.2. Subaraknoid kanamanın olası komplikasyonları (Toth & Cerejo, 2018)

Tekrar kanama
Serebral vazospazm
Gecikmiş iskemik komplikasyonları ve inme
Hidrosefali
Nöbet
Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları
Hacim bozuklukları
Ozmolar bozuklukları
Serebral tuz kaybı
Uyumsuz antidiüretik hormon sendromu
Pulmoner ödem
Kardiyak aritmiler
Takotsubo kardiyomiyopati
Kritik hastalık komplikasyonları (nöropati, miyopati)

2.3.2. Anevrizmal subaraknoid kanama değerlendirme skorları

SAK tanısı konulduktan sonra kanamanın klinik ve görüntüleme özelliklerine göre değerlendirilmesi önemlidir. Değerlendirme skorları, nörolojik durumun şiddetini ve prognostik tahminini değerlendirmede yaygın olarak kullanılır. Hastaneye başvuran hastalardaki nörolojik bozukluğun şiddeti ve subaraknoid boşluğundaki kan miktarı, klinik sonuçların en güçlü belirleyicileridir. aSAK risk tahmini ve tedavinin belirlenmesinde en sık kullanılan SAK derecelendirme skalası Hunt-Hess sınıflandırılmasıdır. Skorun temeli; meningeal irritasyon bulguları, nörolojik defisitlerin şiddeti ve bilinç düzeyi dahil klinik bulgulara dayanır. Hastanın nörolojik değerlendirmesinde yaygın olarak kullanılan diğer skor, Glaskow Koma Skalası (GKS) skorunu ve motor defisitlerin varlığını veya yokluğunu içeren WFNS (World Federation of Neurosurgical Societies) skorudur. Hunt-

Hess ve WFNS derecelendirme skorları sırasıyla Tablo 2.2. ve 2.3.'te özetlenmiştir (Rouanet & Silva, 2019; Tawak et al., 2021).

Tablo 2.2. Hunt-Hess skoru (Tawak et al., 2021)

Derece	Klinik Tablo
I	Asemptomatik, çok hafif ense sertliği, hafif baş ağrısı
II	Orta-şiddetli baş ağrısı, ense sertliği, kranial sinir felci dışında nörolojik defisit yok
III	Uyku meyilli, konfüzyon, orta fokal nörolojik defisit
IV	Stupor, orta-ciddi hemiparazi
V	Koma, deserebre postür

Tablo 2.3. WFNS skoru (Rouanet & Silva, 2019)

Derece	Glaskow Koma Skoru	Motor Defisit
I	15	Yok
II	14-13	Yok
III	14-13	Var
IV	12-7	Yok/Var
V	6-3	Yok/Var

Radyolojik bulgulara en sık Fisher skoru kullanılmaktadır. Fisher skorunun temel amacı, SAK sonrası gelişebilecek gecikmiş serebral iskemi/vazospazmı tahmin etmesidir. Fisher skoru Tablo 2.4.'te gösterilmektedir (Rouanet & Silva, 2019).

Tablo 2.4. Fisher skoru (Rouanet & Silva, 2019)

Derece	Bulgu
1	Subaraknoid kanama yok
2	Diffüz, 1mm altında kanama
3	1mm üzerinde lokalize kanama
4	İntraserebral veya intraventriküler kanama

Modifiye Rankin Skalası (mRS), felçten iyileşmeyi değerlendirmek için yaygın olarak uygulanan ve ortaya çıkan akut inme tedavisine ilişkin randomize klinik çalışmalarda birincil son nokta olarak uygulanan, klinisyen tarafından bildirilen bir ölçüdür. mRS ağırlıklı olarak global sakatlık (özellikle fiziksel sakatlık) ve yardım ihtiyacına yöneliktir. Global bir sakatlık ölçüsü olarak mRS'nin geniş kategorileri (Tablo 2.5.), günlük yaşamın enstrümental aktivitelerini (yemek hazırlamak, alışveriş yapmak, yürüme, giyinme, bakım vs.), riskte olan motor fonksiyonuna vurgu yaparak içerir. Böylece klinisyene, biliş ve dil, sosyal işlevsellik ve inme sonrası duygudurum bozuklukları, özellikle depresyon gibi bir kişinin öz bakımı ve sağlığı için gerekli olan fiziksel olmayan nitelikleri dikkate almasına izin verir (Banks & Marotta, 2007).

Tablo 2.5. Modifiye rankin skalası (Banks & Marotta, 2007)

Derece	mRS
1	Belirli bir sakatlık yok (Günlük yaşamın tüm olağan işlerini yapabiliyor)
2	İlımlı sakatlık (Bazı aktiviteleri yapamamak fakat yardımsız kendi işlerini yürütebilmek)
3	Orta derecede sakatlık (Bazı yardımlara ihtiyaç duymak yardımsız yürüyebilmek)
4	Orta derecede ağır sakatlık (Yürüyemez, gereksinimleri beceremez)
5	Ağır sakatlık (Yatağa bağımlı)
6	Ölüm

2.4. Kodlamayan RNA

İnsan genomunun yaklaşık %90'ı kopyalanır ancak %2'si protein kodlayan mRNA'lara çevrilir. Çevrilmeyen genomik dizilerin transkriptleri kodlamayan RNA (ncRNA) molekülleri olarak adlandırılmaktadır. NcRNA'lar gen ekspresyonu düzenlenmesinin yanı sıra patolojik süreçlerde de rol oynarlar. Heterokromatin oluşumunu yönlendirerek kromatin yapısını yeniden şekillendirirler. Ayrıca cis ve trans gen düzenlenmesine katılabilir ve gen ekspresyonunu artırabilir veya susturabilirler. Bu düzenlenmeler, insanlarda proliferasyon, farklılaşma, rejenerasyon ve apoptozu etkileyerek homeostazın korunmasına yardımcı olmaktadır (Y. Li et al., 2020). Kodlamayan RNA'lar, Housekeeping ncRNA'lar ve düzenleyici ncRNA'lar olmak üzere işlevlerine göre sınıflandırılırlar. Düzenleyici ncRNA'lar büyüklüklerine göre küçük kodlamayan RNA'lar (siRNA'lar, miRNA'lar ve piRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lara ayrılır (Wei et al., 2017).

2.5. MikroRNA

MikroRNA (miRNA), gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde kritik rol oynayan küçük (18-22 nükleotid) protein kodlamayan RNA'lardır. MiRNA'ların hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre farklılaşması gibi birçok biyolojik süreci düzenleme potansiyeli bulunmaktadır (Gareev et al., 2021). Her miRNA yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilir ve böylece bir çok genin ekspresyonunu etkileyebilmektedir (Brenowitz, 2017). MiRNA'ların rolü kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere birçok hastalıkta kanıtlanmıştır (Lopes et al., 2018).

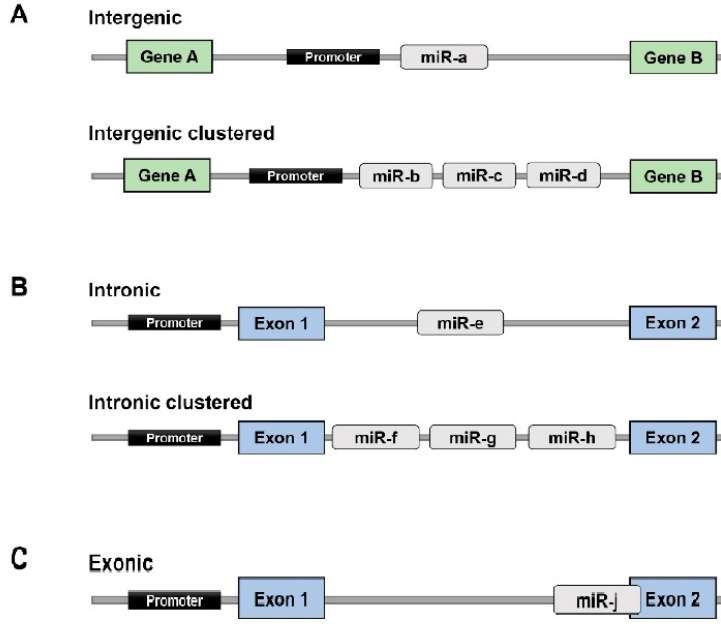
2.5.1. MiRNA'nın genomik organizasyonu

MiRNA'lar protein kodlayan genler ve kodlamayan transkriptler dahil olmak üzere genomun hemen hemen tüm bölgelerinde bulunan genler tarafından kodlanırlar (Balacescu et al., 2019). Genomik yerleşimlerine göre miRNA genleri, intergenik (genler arası) ve intragenik (gen içi) miRNA'lara ayrılabilir. İntergenik miRNA'lar bağımsız transkripsiyon birimlerine sahiptir ve kendi promotörleri vardır. Bilinen miRNA genlerinin yaklaşık yarısı intergenik bölgede bulunmaktadır. İntragenik miRNA'lar, host genlerinin (miRNA'ların bünyelerinde yer aldığı genler) intronik veya ekzonik bölgelerinde bulunur. Bu miRNA'lar tek bir miRNA geni veya kümeler halinde dağılmış olabilirler. İntronik miRNA'lar, hem

protein kodlayan hem de kodlamayan genlerin intronlarında bulunur. İntronik miRNA genleri, host genleri ile birlikte veya kendilerine özgü promotörler tarafından kopyalanabilirler. Ekzonik miRNA'lar ise genellikle kodlamayan genlerin bir ekzonu ve bir intronu boyunca üst üste binmiş halde bulunurlar ki bu miRNA sınıfı, diğer iki tipe göre nadir görülür. MiRNA'ların genomik yerleşimleri Şekil 2.3.'te gösterilmektedir (Jiu et al., 2015; Wong et al., 2016).

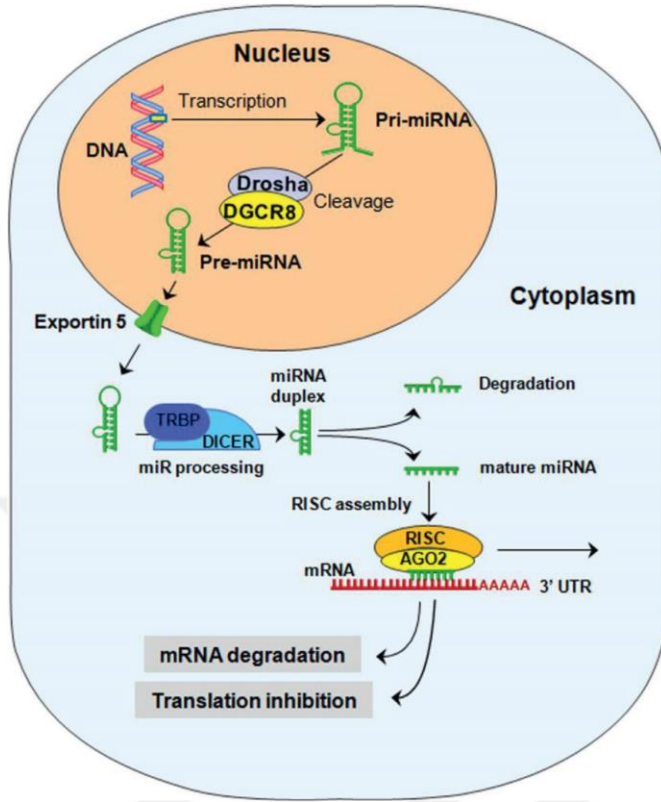
2.5.2. MiRNA biyogenezi ve fonksiyonu

MiRNA biyogenezinde, DNA'dan ilk olarak çoğunlukla RNA polimeraz II enzimleri tarafından yüzlerce veya binlerce nükleotid uzunluğunda miRNA'nın öncül transkripti olan, saç tokası şeklinde pri-miRNA sentezlenir. Pri-miRNA'ların 5' ucunda 7-metil-guanozin cap ve 3' ucunda poli A kuyruğu bulunmaktadır. Transkripsiyonu takiben, bir RNA polimeraz III enzimi olan Drosha ve onun kofaktörü olan DGCR8 (DiGeorge sendromu kritik bölge 8) birlikte mikroişlemci kompleksi denilen büyük bir protein yapısı oluştururlar. Bu kompleks saç tokası yapıdaki molekülü keser ve 5' ucunda monofosfat, 3' ucunda 2 nükleotid hidroksil uzantısı bulunan yaklaşık 70 nükleotid boyutunda olan pre-miRNA'yı oluşturur. Çekirdek zarında bulunan Ran-GTP bağımlı bir protein olan Exportin-5 ile sitoplazmaya geçen pre-miRNA, burada bulunan bir RNA polimeraz III enzimi olan DICER tarafından işlenerek yaklaşık 18-22 nükleotidlik uzunluğunda matür miRNA'ya dönüşmektedir. Bu çift iplikli RNA molekülünün bir ipliği yıkılır, ATP bağımlı bir biçimde RNA ile indüklenen susturma kompleksine (RISC, RNA-induced silencing complex) aktarılır ve Argonaute (AGO) proteini ile kompleks oluşturur. Bu kompleks mRNA'nın yıkımı veya translasyonel baskılama gibi fonksiyonları yönlendirmektedir (Filardi et al., 2020).



Şekil 2.11. MiRNA’ların genomik yerleşimleri A) İntergenik miRNA’lar genler arasındaki genomik bölgelerde, tek bir miRNA geni veya miRNA gen kümesi halinde bulunabilirler. B) İntronik miRNA’lar hem protein kodlayan hem de kodlamayan genlerin intronlarında bulunurlar. İntergenik miRNA’lar gibi tek veya kümeler halinde olabilirler. C) Ekzonik miRNA’lar diğer miRNA tiplerine göre çok daha nadirdir ve genellikle kodlamayan genlerin bir ekzonu ve bir intronu ile örtüşür (Wong et al., 2016).

Bu kompleks tarafından mRNA’nın tanınması genelde miRNA’nın 5’ ucundaki 2-8 nükleotidin yer aldığı bir tohum dizisi (seed sequence) bölgesine dayanmaktadır. Kompleks mRNA’nın 3’ UTR bölgesine kısmi bütünleyecilik (komplementerlik) ile bağlanırsa, mRNA’nın translasyonunu inhibe ederken tam bütünleyecilik ile bağlanırsa mRNA’yı parçalayarak engeller (Carcinoma & Lao, 2020). MiRNA biyogenezi Şekil 2.4.’te özetlenmiştir.



Şekil 2.12. MiRNA biyogenezi. MiRNA'ların biyogenezi çekirdekte pri-miRNA transkripsiyonu ile başlar. Pri-miRNA, Dorsha ve DGCR8 tarafından yaklaşık 70 nükleotidlik pre-miRNA'ya dönüştürülür ve Exportin-5 aracılığıyla sitoplazmaya aktarılır. DICER enzimi tarafından enzimatik işleminden sonra çift iplikli miRNA'lar (18-22 nükleotid) tek iplikli olgun miRNA'ya dönüşmektedir. Matür miRNA, Argonaute ve RISC kompleksiyle etkileşime girer ve genellikle mRNA'nın 3'UTR bölgesini hedefleyerek mRNA'nın degradasyonu veya translasyonun inhibisyonuna yol açacaktır (Balacescu et al., 2019).

2.6. Sirküle miRNA'lar

Sirküle miRNA'lar hücresel gelişme, farklılaşma, proliferasyon, apoptoz ve metabolizma gibi birçok temel hücresel süreci düzenleyebilir ve birçok genin ekspresyonunu etkileyebilmektedir (Terrinoni et al., 2019). Sirküle miRNA'lar hücre dışı serum, plazma, BOS, tükürük ve süt gibi vücut sıvılarında bulunur ve çeşitli olaylar sonucunda üretilir veya salgılanabilmektedir. Sirküle miRNA'lar 1) yaralanma, kronik inflamasyon, apoptoz veya nekroz sonucu zarar gören hücrelerden veya trombositler gibi

kısa yarı ömrü olan hücrelerden sızıntı yaparak 2) mikropartiküller, eksozomlar ve apoptotik cisimler gibi veziküller yoluyla veya 3) bir protein-miRNA kompleksi (lipoprotein veya Argonaute proteine bağlanarak) yoluyla salgılanmaktadırlar (Kamal & Shahidan, 2020).

2.6.1. Bioyarker olarak sirküle miRNA'lar

Dolaşımdaki miRNA'lar, (1) eksozomlar veya apoptotik cisimler gibi veziküllerde paketlenmeleri, (2) RNA katlanmaları ve boyutları ve/veya (3) Ago içeren ribonükleik asit:protein (RNP) kompleksleri içerisinde bulunmaları nedeniyle vücut sıvılarında oldukça kararlılırlar ve uzun bir yarı ömre sahiplerdir. MiRNA'ların stabilitesi, ribonükleazların etkisine karşı dirençli olmalarından kaynaklanır ki bu özelliği biyolojik sıvılarda uzun ömürlü olduklarını göstermektedir. Kan türevleri, tükürük veya idrar gibi vücut sıvılarının toplanması yoluyla kolay erişilebilir olmaları da dolaşımdaki miRNA'ların tanısal ve prognostik değerdendirmelerde biyobelirteç olarak ideal bir kaynak olabileceği pek çok çalışma ile ortaya konmuştur. Ayrıca, deneysel çalışmalarda endojen dolaşımdaki miRNA'ların yüksek sıcaklıklar, tekrarlanan donma-çözölme döngüleri, çok düşük veya yüksek pH seviyeleri, kaynama ve uzun depolama süresi gibi farklı stres koşullarına karşı dirençli oldukları bildirilmiştir. Bu özellikler dolaşımdaki miRNA'ların potansiyel biyobelirteçler olarak yararlanmada pozitif özelliklerdir. Sirküle miRNA'ların profili doku ve hastalığa bağlı olarak yüksek spesifite gösterebilir. Dolayısıyla, vücut sıvıları aracılığıyla sirküle miRNA'lara kolay erişilebilirlik, X-ışını, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntölleme gibi pahalı ve uzmanlık gerektiren prosedürlerin yerine kullanılabilirliği özellikle doku biyopsisi gibi tekrarlayan invaziv prosedürlerin önlenmesi, biyopsi alınamayacak kadar küçük lezyonlarda örnekleme sınırlamalarından kaçınılması açısından umut verici olduğu bildirilmektedir. Tüm bu özellikler ideal tanı ve prognostik belirteç olarak sirküle miRNA'ların kullanılmasını gündeme getirmiştir (Gareev et al., 2021; Kamal & Shahidan, 2020).

2.6.2. Kanamış ve kanamamış intrakranial anevrizma patogeneğinde sirküle miRNA'lar

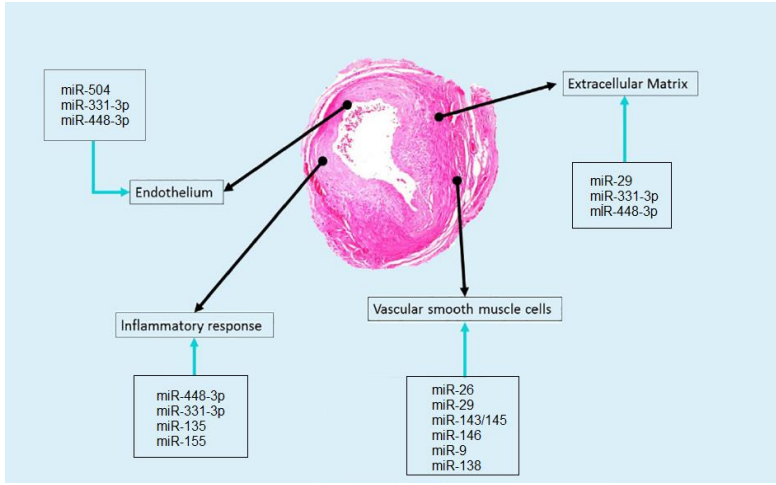
Bugüne kadar İA'ların tanı ve prognozunda imünolojik, genetik, inflamatuvar belirteçlerin yanısıra anjiyogenez veya hücre adezyonu ile ilişkili faktörler değerdendirilmiş olmasına rağmen İA'ların oluşumu, ilerlemesi ve kanamasını tahmin edebilecek spesifik ve

duyarlı hiçbir bağımsız biyomarker saptanmamıştır. Buna karşılık sirküle miRNA'ların tanı ve prognozda potansiyel belirteç olabilme özelliklerine rağmen kanamış ve kanamamış İA'ların tanı ve prognozunda invaziv olmayan biyomarker olarak değerlendirildiği çok sınırlı araştırma bulunmaktadır (Gareev et al., 2021). Bu çalışmalarda belirli sirküle miRNA'ların ekspresyon profillerindeki değişikliklerin yüksek kanama riskiyle ilişkili olabileceği ve ayrıca hastalığın gelişiminin erken evrelerinde saptanabileceği bildirilmiştir. İnme ve alt tiplerinin daha hızlı ve doğru tanısı için umut verici bir biyomarker olabileceği belirtilmiştir. Kan veya BOS'taki sirküle miRNA'lar, küçük boyutları ve kimyasal bileşimleri nedeniyle, çoğu biyolojik molekülden daha az karmaşıktır, bu da analizlerini basitleştirmektedir (Gareev et al., 2021).

2.7. MiRNA Ekspresyon Profilleri ve İntrakranial Anevrizma

Oluşumunun Mekanizmaları

İA'lı hastalarda miRNA ekspresyon değişikliği iyi tanımlanmış olmasına rağmen hastalığa özgü hücresel işlevler ve yollar büyük oranda bilinmemektedir. Vasküler sisteminin dört önemli kompartmanı anevrizmanın patogeneğinde yer almaktadır. Bunlar; endotel, vasküler düz kas hücreleri, hücre dışı matriks (ECM) ve son olarak inflamatuvar yanıtı düzenleyen damar içinde ve dışında dolaşan immün hücrelerdir. Kompartmanlar Şekil 2.5.'te gösterilmiştir. İA ile ilişkili miRNA analizleri, miRNA'lar ile bu hücresel ve moleküler mekanizmalar arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Farklı miRNA'ların bu süreçleri etkileyebileceği ve böylece hastalığın ilerlemesi veya tedavisinde olası hedef olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (Rikhtegar et al., 2021).



Şekil 2.13. Vasküler sistemde anevrizma patogeneğinde yer alan dört kompartman. İA oluşumu sürecinde bilinen bazı miRNA’lar ve hedefleri (Rikhtegar et al., 2021)

2.7.1. Endotel disfonksiyonu

İA’lar yaygın olarak damar dallanma bölgelerinde ortaya çıkarlar. Bu durum anevrizma oluşumu ile ilişkili patolojik vasküler yeniden şekillenmede kan akış geriliminin rolünü vurgulamaktadır. Kan akış geriliminin özellikle damar bifurkasyonlarında uzun süreli inflamatuvar yanıtı başlattığı gösterilmiştir. Kan akış ile damar duvarı arasında arayüz olan endotel, vasküler sistemde mekanik strese yanıt vermekte merkezi bir rol oynar. Endotel hücreleri, mekanik transdüksiyon yoluyla gerilme ve akışın mekanik uyarıcılarını yönlendirir. Endotel hücrelerin apikal ve bazal yüzeylerinde bulunan çoklu mekanik sensörler, bu hücrelerin fiziksel yapılarını değiştirmelerine ve sürekli bir inflamatuvar yanıtla sonuçlanan hücre içi kaskadları başlatmalarına izin verir.

Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B), endotel disfonksiyonunda, ateroskleroz ve İA’lar dahil olmak üzere bir çok vasküler patolojilerde ortaya çıkan proinflamatuvar durumlarda önemli rol oynamaktadır. NF- κ B yolağı, hücresel adezyon moleküllerinin ve inflamatuvar sitokinlerin (IL6, IL-8, intrasellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve E-selektin) ekspresyonuna yol açan bir dizi olayı başlatır. Bu sinyal molekülleri, subendotel boşluğa göç eden ve endotel geçirgenliğini artıran monositleri toplar.

MiRNA’ların normal endotel hücre fonksiyonu ve disfonksiyonun altında yatan süreçlerde kritik rol oynadığına ilişkin veriler bulunmaktadır. Ayrıca miRNA’ların endotel

geçirgenliğinin korunmasında yer alan anahtar proteinler olan konneksinleri ve vasküler endotel-kadherin proteinlerini hedef aldığı gösterilmiştir. Endotel disfonksiyonu, patolojik anjiyogenezin başlatılması yoluyla İA ilerlemesinde de rol oynamaktadır. İA duvarlarında mikrovaskülatürün çoğalması sonucunda inflamatuvar hücrelerin orta tabakaya (tunica media) ulaşması ve vasküler düz kas hücreleri ile hücre dışı matriksin degrades olması, bu sürecin muhtemel mekanizmasıdır. İA'lı hastalarda let-7 miRNA ailesi ve miRNA-18a'nın ekspresyonlarının değiştiği gösterilmiştir. Bu miRNA'lar endotel hücrelerinde aşırı eksprese olmakta ve endotel kaynaklı anjiyogenezde rol oynamaktadır. Ayrıca miRNA-16, endotel hücreleri tarafından eksprese edilir ve anjiyogenez ile ilişkilidir (Mc et al., 2015).

2.7.2. Vasküler düz kas hücreleri ve hücre dışı matriks

Vasküler düz kas hücreleri (VDKH), tunika mediasının birincil hücre bileşenini temsil ederler ve damar duvarının bütünlüğünü korurlar. Fizyolojik koşullar altında bu hücreler kontraktıl fenotip gösterirler, ancak inflamatuvar uyarılara maruz kaldıklarında salgı fenotipine geçiş yaparlar. VDKH salgı fenotipi, kontraktilite belirteçlerin kaybı ve proinflamatuvar sitokinlerin ve matriks metalloproteinazların (MMP) ekspresyonu ile karakterizedir. Endotel disfonksiyonu, hemodinamik stres ve yaralanma, bu fenotipik değişikliği tetikleyen uyarılar olarak tanımlanmıştır. Salgı VDKH'ler ayrıca göç edebilir hale gelirler bu da duvar hücrelerinin kaybına ve damar duvarının zayıflamasına neden olur. İA oluşumu, tunika medianın ilerleyici incilmesi, hücre kaybı, düzensiz VDKH göçü ve apoptoz ile tanımlanır. Rüptüre olmuş anevrizmalar, rüptüre olmamış anevrizmalara göre daha yaygın hiposellüler ve hyalinize duvarlar gösterirler (Mc et al., 2015).

Önceki çalışmalarda rüptüre anevrizma vakalarının İA kubbelerinde 18 miRNA'nın önemli ölçüde aşağı regüle olduğu, bu ekspresyon değişikliklerinin VDKH fenotipini ve ECM'nin devamlılığını düzenleyen çeşitli hücresel süreçlerle ilişkili olduğu bulundu. MiR-29b'nin downregülasyonu VDKH'lerin fenotipik modülasyonunu uyarmakta ve ATG14-aracılı otofajiyi aktive etmektedir. Dolayısıyla, İA'ların oluşumu, büyümesi ve kanamasında önemli bir öncül olduğu gösterilmiştir. MiR-145, VDKH fizyolojisini ve homeostazisini düzenler, damar duvar kalınlığı ile ilişkilidir. MiR-145 eksikliği damar duvarının histomorfolojisinde bozulmaya ve düz kas hücre hipotrofisine neden olur. Anevrizmalarda miR-145'in downregülasyonu bildirilmiştir ki miR-145, KLF-4'ü hedefleyerek VDKH'nin fenotipini etkilemektedir. MiR-1 KLF-4'ü hedefleyerek düz kas

hücrelere özgü kontraktil proteinlerin ekspresyonunu artırmakta ve İA gelişimine katkıda bulunmaktadır (Rikhtegar et al., 2021).

Fizyolojik koşullar altında hücre dışı matriksin korunması genelde matriks metalloproteinazların (MMP) aktivitesi ile matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri arasındaki dengeye bağlıdır. Bu dengenin bozulması kollajen ve elastin gibi hücre dışı matriks proteinlerinin parçalanmasının artmasına neden olur ki bu değişim damar duvarının zayıflamasına ve hemodinamik strese karşı duyarlılığının artmasına yol açar. Sonuç olarak hücre dışı matriksin degradasyonu, İA oluşumu, ilerlemesi ve kanamasında temel bir bileşen olarak tanımlanmıştır. aSAK hastalarının serumunda yüksek MMP-9 seviyelerin bulunduğu bildirilmiştir.

İA büyümesi ve kanamasında MMP ve matriks metalloproteinazların doku inhibitörlerinin önemi, miRNA profillenme analizinde gösterilmiştir. İA hastalarında dermal fibroblastlarda, kollajen ekspresyonunun negatif düzenleyicisi olan miRNA-7'nin anlamlı upregülasyonu görülmüştür (Mc et al., 2015). MiR-29, kollajen, elastin ve fibrillinler dahil olmak üzere hücre dışı matriks proteinlerinin ekspresyonunu baskılayarak anevrizma oluşumunda rol oynamaktadır (Rikhtegar et al., 2021).

2.7.3. İnflamasyonun mediyatörleri olan kodlamayan RNA'lar

Kodlamayan RNA'lar, inflamatuvar sinyal yolağı gibi çeşitli hücre sinyal yolaklarında önemli düzenleyeci rollere sahiptir. Bu moleküllerden etkilenen üç ana sinyal yolağı JAK/STAT, NF- κ B ve MAPK yolaklarıdır. MiR-146, miR-135, miR-125 ve miR-155 gibi çeşitli bilinen kodlamayan RNA'lar, MAPK, NF- κ B, JNK, ERK ve p38 mediyatörlerin fonksiyonunu etkileyerek inflamatuvar yanıtı azalttıkları gösterilmiştir. Kodlamayan RNA'ların, dendritik ve makrofaj hücrelerin olgunlaşması, NK hücrelerinin farklılaşması ve fonksiyonu ile granülosit çoğalması, farklılaşması ve fonksiyonunda rol oynarlar. Kodlamayan RNA'lar ICAM-1, E-selektin ve VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu da düzenlerler. Bu da immün hücre infiltrasyonunun modülasyonu ile sonuçlanır. Ayrıca sitokin ekspresyonu, inflamasyonu modüle eder ve pro- ve anti- inflamatuvar denge, immün yanıtın genel yönelimini gösterir.

Kodlamayan RNA'lar, inflamatuvar yolakların epigenetik regülasyonu üzerindeki etkilerine göre proinflamatuvar ve antiinflamatuvar gruplara ayrılırlar. Bu moleküller

sitokinlerin ekspresyon seviyelerini değiştirebilirler ve miRNA'ların üretimi sitokinlerin kontrolü altındadır. Proinflamatuvar miRNA'ların dolaşımdaki seviyeleri apoptoz, otofaji, endoplazmik retikulum stresi, nekroz ve ölümlü etkileyen makrofaj infiltrasyonuna, inflamasyona ve insülin direncine yol açan bazı immün belirteç ve bozuklukla ilişkilidir (Rikhtegar et al., 2021).

2.8. İntrakranial Anevrizmalarda Önemli Bir Patolojik Süreci Olan İnflamasyon

Anevrizmalar ve çeşitli damar patolojilerinde inflamasyon önemlidir. Makrofajların, İA duvarlarına giren anahtar inflamatuvar bileşenler oldukları düşünölmektedir. Makrofaj infiltrasyonu hem kanamış hem de kanamamış İA'larda gözlenmesine rağmen, bu sürecin yoğunluğu, düz kas hücrelerinin kaybı ve İA duvarındaki kollajen tabakasının bozulması ile ilişkili görönmektedir. T lenfositler, İA duvarlarında tespit edilen diğer inflamatuvar hücrelerdir. T hücre sayısı ile İA kanaması arasında pozitif ilişki bulunmaktadır. T lenfositler, inflamatuvar reaksiyonuna aktif olarak katılırlar ancak artan infiltrasyonları kanamanın nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu hala bilinmemektedir.

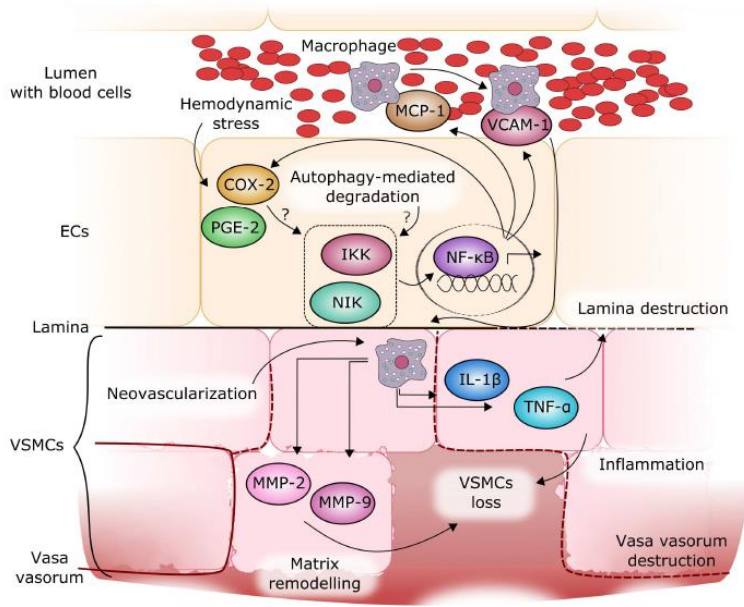
In vivo çalışmalar, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve NF- κ B sinyal aktivasyonunun anevrizmaların oluşumu ve kanamasında başlangıç adım olabileceğini göstermişlerdir. Literatürlere göre karmaşık bir inflamatuvar kaskadın ilk oyuncusu kan akışı ve hemodinamik streştir. Böylece NF- κ B aracılı yolak ile proinflamatuvar genlerin ekspresyonu indüklenir, apoptoza aracılık eder ve endotel hücrelerinden proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına sebep olur (Pawlowska et al., 2018; Rikhtegar et al., 2021). NF- κ B'nin aşırı aktivasyonu, siklooksijenaz-2 (COX-2), prostaglandin E2 (PGE2) ve İA ilerlemesini uyaran diğer faktörlerle inflamatuvar proteinlerin ekspresyonuna yol açar. NF- κ B ayrıca endotel hücreleri ve vasa vasorum arasındaki bağlantılardan damar duvarına nüföz eden, makrofajların toplanması ve adezyonundan sorumlu monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve VCAM-1 ekspresyonunu da indükler.

Makrofajlar, TNF- α , interlökin 1 beta (IL-1 β), metalloproteinazlar ve ayrıca duvarın yapısını yeniden şekillendiren diğer proteazlar ile diğer proinflamatuvar moleküllerini serbest bırakır. NF- κ B, İA oluşumu sırasında endotel hücrelerinde ve İA duvarlarındaki makrofajlarda aktive edilir. NF- κ B ayrıca İA hastalarında gözlenen

prokollajen tip I ve III gen ekspresyonunun downregölasyon mediatörüdür. Birkaç sitokin, İA oluşumu ile ilişkilidir. MCP-1, monosit ve T lenfositlerin göçünü ve infiltrasyonunu modüle eden bir kemokindir. Sıçanlarda İA oluşumunun erken aşamasında, İA duvarında MCP-1 geninin artmış ekspresyonu bulunmuş. Ayrıca, MCP-1 nakavt farelerde makrofaj birikiminde ve takiben İA insidansında anlamlı olarak bir azalma gösterilmiştir. Bu nedenle MCP-1'in anevrizma patogeneğinde kritik bir faktör olabileceği düşünölüyor.

VCAM-1, monositlerin toplanmasına katılan diğer inflamatuvar bileşendir. Aynı zamanda monositlerin damar duvarındaki endotel hücrelerine yapışmasını da düzenler. İA vakalarında artmış VCAM-1 ekspresyonu tanımlanmıştır. MCP-1, stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF-1), CXC kemokinler ve VCAM-1 sitokinleri, makrofajların duvar içine toplanmasından sorumludur. Bu nedenle İnflamatuvar reaksiyonu ve damar duvarın yeniden şekillenmesini başlatabilir. Sitokinler anevrizma oluşumu ve ilerlemesinde anahtar rol oynar ve NF-κB aktivasyonuna yol açabilir (Pawlowska et al., 2018). İA oluşumu ve ilerlemesinde inflamasyon mekanizması Şekil 2.6.'da gösterilmiştir.

MiRNA'lar temel nörobiyolojik süreçlerde ve hastalıklarda önemli role sahiptir. MiRNA ve hedef genleri, damar endotel inflamasyonunda, damar hücrelerinin fenotipik değişiminde ve kaybında farklı roller üstlenmişlerdir (Rikhtegar et al., 2021). MiRNA'lar ayrıca inme ve aSAK sonrası santral sinir sistem enflamatuvar yanıtın güçlü düzenleyicisidir (W. X. Wang, Springer, Xie, et al., 2021). İA'ların oluşumu ve kanaması, endotel hücrelerinin disfonksiyonu ile ilişkili olup bazı araştırmacılar miRNA'ların İA oluşumu ile ilişkisini konfirme etmişlerdir. Bu nedenle miRNA'lar, İA'nın inflamatuvar sürecinde rol oynayan epigenetik elemanlardır (R.-K. Wang et al., 2021).



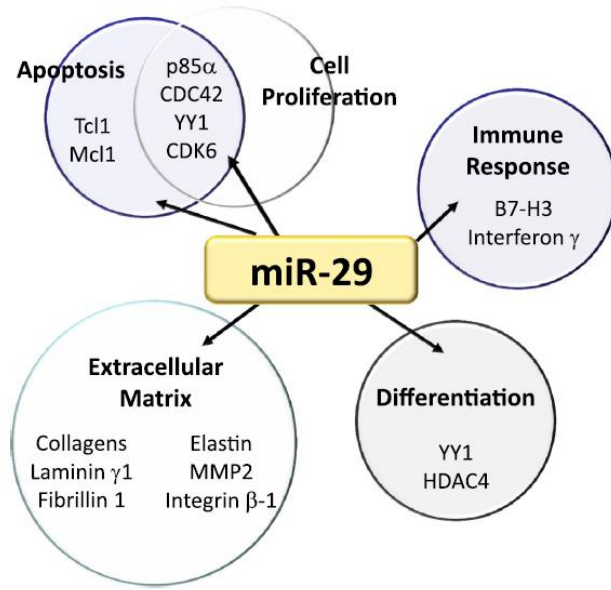
Şekil 2.14. İntrakranial anevrizma oluşumu ve ilerlemesinde inflamasyon mekanizması.

Kan akışı ve hemodinamik stres İA oluşumunun ilk tetikleyicisi olabilir. Bu stres makrofajların NF- κ B aktivasyonundan sonra ekspresde olan MCP-1 tarafından toplanabileceği bazı kırılğan bölgelere neden olabilir. Ayrıca endotel hücrelerinde COX-2 ve PGE-2 gibi proinflamatuvar proteinlerin ekspresyonu ile sonuçlanır. VCAM-1 proteinin katılımıyla endotel hücrelerine yapışan makrofajlar, vasa vasorum yoluyla damar duvarına doğru yolunu bulur, TNF- α , IL-1 β gibi proinflamatuvar proteinleri ve matriks metalloproteinazlar MMP-2 ve MMP9 gibi matriks yeniden şekillendirme proteinleri salgılar. NF- κ B aktivasyonuna, otofaji tarafından düzenlenen IKK (I κ B kinaz) ve NIK (NF- κ B indükleyen kinaz) proteinleri aracılık eder. Bu proteinlerin uyumlu çalışması duvar yapısının daha da zayıflamasına ve nihayetinde kanamasına sebep olabilir. Ancak hala tanımlanmayan bazı faktörlerin etkisi, İA kanamasının son tetikleyicisi olabilir (Pawlowska et al., 2018).

Altta bahsedilen miRNA'lar, yapılan çalışmalarda anevrizmanın patogenezi ile ilişkili olabilecekleri bildirilmiştir.

2.9. Hsa-miR-29a

İnsanlarda miR-29a öncüsünü kodlayan gen kromozom 7q32.3'te lokalizedir. MiR-29, aort gelişimi ve yaşlanmasında ve İA'nın ilerlemesinde bir gen modülatörü olarak bilinir. MiR-29 ailesi, kollajen I, kollajen III, fibrillin-1 ve elastin-1'in fibrotik yanıtında yer almasına rağmen hücre dışı matriks proteinlerini kodlayan gen transkriptlerini düzenlediği bildirilmiştir. MiR-29 ekspresyonu ile fibrotik yanıt arasındaki yakın ilişki ayrıca karaciğer fibrozunda, böbrek fibrozunda, sistematik sklerozda da tanımlanmıştır (W. H. Wang et al., 2016). Aile üyeleri miR-29a/29b/29c aynı tohum dizisini (seed sequence) paylaşırlar ve birçok transkripsiyonel düzenleyici ve sinyal yolları tarafından düzenlenirler. MiR-29 tarafından hedeflenen hücresel süreçler ve genleri Şekil 2.7.'de gösterilmektedir (Ma et al., 2020).



Şekil 2.15. MiR-29 tarafından hedeflenen bir kaç hücresel süreç ve genleri (Kriegel et al., 2012)

Anevrizma kanaması, kollajen üretimi ve fibrozis ile vasküler yeniden şekillenmesinden ziyade kollajen degradasyonun büyümesinden kaynaklandığı bilinmektedir. Kanamış İA'nın vasküler duvarı, dejenere matriks ve kötü düzenlenmiş lümen trombozu gösterir. MiR-29 ailesi, Hücre dışı matriksin anahtar modülatörüdür ve MMP2 ve E-cadherinin düzenlenmesi yoluyla kolorektal kanser metastazını düzenlediği

bildirilmiştir. Birlikte ele alındığında miR-29a overekspresyonu, hücre dışı matriksin düzenlenmesi yoluyla damar duvarını zayıflatarak kanamaya neden olup, böylece İA prognozu üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir. MiR-29a ekspresyonu İA kanaması, Hunt-Hess seviyesi ile ilişkilidir. Bu nedenle İA tanı ve prognozunda yararlı bir biyomarker olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir (W. H. Wang et al., 2016). Anevrizma ilerlemesi ve kanaması ile ilişkili olabilecek genler, biyolojik süreçler ve yollar Tablo 2.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 2.6. MiR-29a ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yollar

Hedef Genler	Biyolojik Süreçler	Yollar
<i>MCL1, PIK3R2, VEGFA, BCL2, COL4A1, COL4A1, ICAM1, MDM2</i>	Apoptoz, hücre farklılaşması, hücre homeostaz, sitokine yanıt, otofaji regülasyonu, kan damar gelişimi, kan damar yeniden şekillenme, hücre döngüsü regülasyonu, hücre adezyonu, anjiyogenez, vaskülogenez ekstrasellüler matriks organizasyonu, kan damar duvar morfolojisi, proliferasyon, MAPK kaskad regülasyonu, sinyal iletimi, hücre-matriks adezyon regülasyonu, immün yanıt	PI3K/AKT yolu, inflamasyon, hücre döngüsü, sinyal iletimi, ekstrasellüler matriks organizasyonu, apoptoz, hemostaz, VEGF sinyal yolu, RAF/MAP kinaz yolu, mitokondriyal yolu

2.10. Hsa-miR-126

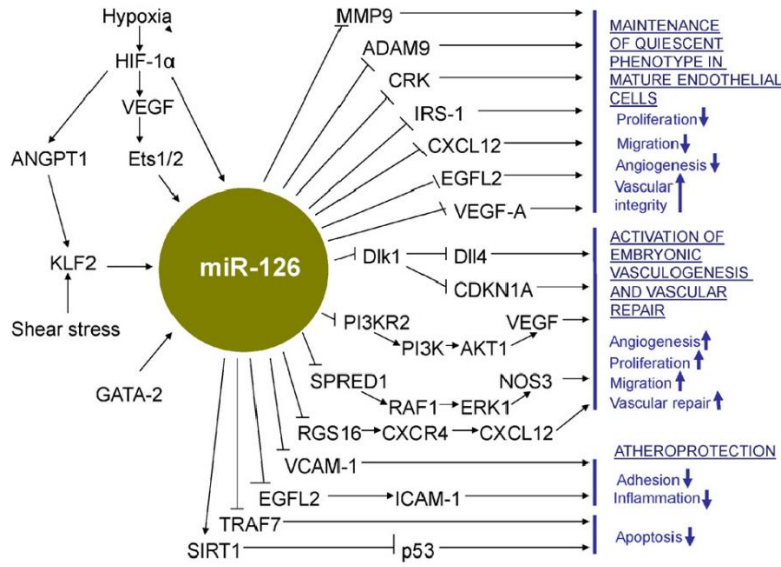
MiR-126, endotel hücrelerinde yüksek oranda eksprese olan bir mikroRNA'dır. İnsan miR-126, hücre göçü ve kan damarı oluşumunda yer alan, 9q34.3 kromozomunda EGFL7 geninin (EGF-like domain-containing protein 7'yi kodlar) intronunda bulunan tek bir gen tarafından kodlanır (Chistiakov et al., 2016). MiR-126, vasküler bütünlüğünde ve anjiyogenezde yer almaktadır. MiR-126 nakavt fare ve zebra balık modellerinde vasküler bütünlüğün azaldığı, endotel hücrelerin proliferasyonu, göçü ve anjiyogenez aktivitesinin bozulduğu görülmüştür (X. M. Fu et al., 2015).

Normal fizyolojik koşullar altında, endotel hücreleri inaktiftir ve adezyon moleküllerini eksprese etmezler, ancak kan-beyin bariyer hasarı gibi patolojik koşullarda çok sayıda ekzojen sitokin üretilir ve endotel hücreleri aktive olarak VCAM-1 eksprese

edilir. Çalışmalar endotel hücrelerinde miR-126'nın VCAM-1 ekspresyonunu inhibe edebildiğini, dolayısıyla endotel hücre adezyonunu ve vasküler inflamasyonu düzenlediğini doğrulamıştır. MiR-126'nın vasküloprotektif ve anti-aterojenik rolü Şekil 2.8.'de gösterilmiştir (X. Fu et al., 2019).

İntraserebral kanama tanılı hastalarda serum miR-126 ile perihematomal ödem arasında ilişki bulunmuş ve artan ekspresyonu, anjiogenezi tetikleyen ve lezyonların büyümesine sebep olduğu bildirilmiştir (Kashif et al., 2021; Yang et al., 2020). MiR-126 ekspresyonu ayrıca cerebral vazospasm ile ilişkilidir. İA'lı hastalarda kanama sıklığı, hipertansiyon öyküsü, Hunt-Hess derecesi ve yüksek miR-126 ekspresyonu serebral vazospasm için bağımsız risk faktörü olarak bildirilmiştir (Luo et al., 2022).

Anevrizma oluşum, ilerlemesi ve kanaması ile ilişkili olabilecek genler, biyolojik süreçler ve yollar Tablo 2.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.16. MiR-126'nın vasküloprotektif ve anti-aterojenik rolü. Endotel miR-126 ekspresyonu, anjiyogenik faktörler (VEGF, anjiyopöietin-1), kan akış gerilimi ve hipoksi ile indüklenebilir. MiR-126, anjiyogenez, proliferasyon ve göçü inhibe ederek vasküler bütünlüğünü destekler ve endotel hücrelerde inaktif fenotipi korur. MiR-126 ayrıca anjiyogenik aktivasyonu, proliferasyonu ve hareketliliklerini baskılayarak endotel progenitör hücrelerini dinlenme durumunda tutar. MiR-126, hipoksi ve oksidatif stres kaynaklı apoptozu önleyerek endotel hücrelerin sağkalımını artırır. MiR-126 adezyon molekülleri olan VCAM-1 ve ICAM-1'in ekspresyonunu inhibe ederek lökositlerin proaterojenik toplanmasını ve endotel hücrelerin inflamatuvar aktivasyonunu inhibe eder. Vasküler hasar ve hipoksik koşullarda miR-126, proanjiyogenik sinyal RAF1/Erk1 ve PI3k/Akt'yi baskılayarak, proliferatif Notch sinyalini etkinleştirerek ve CXCR4/CXCL12'yi uyararak endotel progenitor hücrelerin kemotaksisini artırır. Böylece endotel hücre ve endotel progenitor hücre-aracılı vasküler onarımını indükler (Chistiakov et al., 2016)

Tablo 2.7. MiR-126 ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yollar

Hedef Genler	Biyolojik Süreçler	Yollar
<i>VEGFA, CXCR4, BCL2, CRKL, EGFL7, PIK3R2, SPRED1, VCAM1, MDM2, PMAIP, MYC, CCND1, PI3CA, TGFBR2</i>	Anjiyogenez, vaskülogenez, MAPK kaskad regülasyonu, sinyal iletimi, hücre adezyonu, hücre-matriks adezyonu, vasküler endotel büyüme faktörü uyarısına hücrel yanıt, TGF beta reseptör sinyal yollar regülasyonu, ERK1 ve ERK2 kaskad regülasyonu, immün yanıt, fosfatidilinositol 3-kinaz aktivitesinin regülasyonu, kan damar gelişimi, vasküler fonksiyonu	İnflamasyon, sinyal iletimi, hemostaz, VEGF sinyal yolağı, ekstrasellüler matriks organizasyonu, MAPK, PI3K/AKT yolağı, apoptoz, kemokin reseptör yolağı

2.11. Hsa-miR-200a-3p

MiR-200 ailesi, kromozomal konumları ve tohum dizilerine göre genomik ve fonksiyonel kümelerde gruplandırılmış beş miRNA üyesinden oluşur. Birinci kromozom üzerinde lokalize miR-200a, miR-200b ve miR-429 genomik küme I'i oluştururken genomik küme II, 12. kromozomu üzerinde lokalize miR-200c ve miR-141'den oluşur. MiR-200 ailesi birçok hücre tipi tarafından eksprese edilir, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojik süreçlerde yer alır (Du et al., 2022). MiR-200 ailesi, vasküler endotel hücreleri ve kan damarlarının fonksiyonları ile ilişkilidir. Vücuttaki vasküler endotel hücrelerinin ve kan damarlarının bütünlüğü için önemli olan bir tür anjiyogenez sinyal düzenleyici faktörüdür (Xue et al., 2020).

MiR-200 kümesi, düz kas hücrelerin fenotipik değişiminde kritik bir düzenleyici olarak tanımlanan QKI'ı hedefleyerek, düz kas hücrelerin proliferasyonunda ve göçünde güçlü bir baskılayıcı olarak işlev görür. Düz kas hücrelerinde yapılan bir çalışmada miR-200a, miR-200b ve miR-429'un triple inhibisyonu, düşük bir QKI seviyesini koruduğu ve proliferasyon, göç ve neointima oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir (Du et al., 2022).

Çaşmalarda miR-200a-3p ekspresyonu sadece rüptüre olan hastalarında arttığını, rüptüre olmayan hastalarında artış olmadığını göstermiştir ve İA gelişimi ve kanama riski tahmininde biyomarker olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Meeuwsen et al., 2017).

Anevrizma ilerlemesi ve kanaması ile ilişkili olabilecek genler, biyolojik süreçler ve yollar Tablo 2.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.8. MiR-200a-3p ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yollar

Hedef Genler	Biyolojik Süreçler	Yollar
<i>PDS5B, CXCL12, CTNNB1, TGFB1</i>	Kan damar morfogenez, vaskülogenez, damar gelişimi, hücre proliferasyonu, hücre adezyonu, hücre farklılaşması, mezenkimal hücre proliferasyon regülasyonu, hematopoiez, apoptoz, düz kas hücre farklılaşması, enflamatuvar yanıt, sinyal iletimi, hücre döngüsü regülasyonu, ekstrasellüler matriks	WNT, apoptoz, inflamasyon, hücre iletimi, VEGF sinyal yolağı, hücre proliferasyonu, TGF beta reseptör sinyal, hücre dışı matriks organizasyonu

2.12. Hsa-miR-451a

MiR-451 ilk kez 2005 yılında Altuvia ve arkadaşları tarafından insan hipofiz bezinde tanımlanmış. Bu miRNA'yı kodlayan gen, insan kromozomal bölgesi 17ql1.2'de lokalizedir. MiR-451, hematopoetik sistem farklılaşması, embriyonik gelişim, epitel hücre polaritesi ve sinir sisteminin gelişimi dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik sürece katılır. Birçok kanserde ekspresyonu düzensizdir ve proliferasyon, apoptoz, anjiyogenez, epitelyal-mezenkimal geçiş, ilaç direnci ve metastaz gibi çok sayıda biyolojik süreçte rol oynar (Bai & Wu, 2019). MiR-451a ekspresyonu rüptüre olan İA'lı hastalarda vasküler düz kas hücre farklılaşması ve vazospazm gelişmesinde rol oynar. SAK sonrası gelişen serebral vazospazmın medyatörleri olarak bilinmektedir. Vazospazm gelişen damarlarda gelişmeyen damarlara göre azalmış miR-451a seviyeleri AMPK yolağı bileşenlerinin fosforilasyonu ile bağlantılıdır.

MMP-2 ve MMP-9, miR-451'in hedef genleri arasındadır. MMP-2 ve MMP-9, hücre dışı matriksin sıkı bağlantılarını ve bazal membran proteinlerini bozarak immün hücrelerini yaralanma bölgesine taşınmasını kolaylaştıran jelatinazlar/kollajenazlardır. SAK ve komplikasyonların patogeneğinde önemli hedef genler oldukları düşünülmektedir.

(Stylli et al., 2017). Anevrizma ilerlemesi ve kanaması ile ilişkili olabilecek genler, biyolojik süreçler ve yollar Tablo 2.9.'da gösterilmiştir.

Tablo 2.9. 451a ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yollar

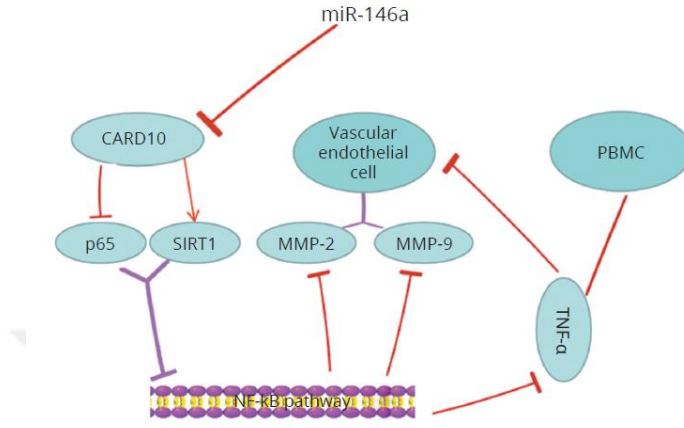
Hedef Genler	Biyolojik Süreçler	Yollar
<i>MIF, CAV1, ETS1, ADAM10, MMP2, MMP9, IL6R, CAB39, MYC, BCL2, PIK3CA, CAB39, ABCB1, AKT1, RAB14, TMED7, CPNE3, RAB5A, DCBLD2, IKBKB</i>	İmmün yanıt, sitokin üretimi, hücre proliferasyonu, fosforilasyon, apoptoz, sinyal iletimi, peptidil-serin fosforilasyonu, serin/treonin kinaz regülasyonu, vasküler endotel büyüme faktörü üretimi, sitokine yanıt, MAPK kaskad regülasyonu, düz kas hücre proliferasyonu, hücre göçü, hücre dışı matriks organizasyonu, kollajen katabolik süreç, hücre sinyalizasyonu, hücre dışı matriks parçalama, monosit aktivasyonu, anjiyogenez regülasyonu, hücre farklılaşması, vaskülogenez, düz kas kasılmasının regülasyonu, hipoksiye yanıt, endotel hücre proliferasyonu	İnflamasyon, interlökin sinyal, mTOR sinyal, sinyal iletimi, MAPK, hücre dışı matriks organizasyonu, MMP aktivasyonu, kollajen oluşumu ve degradasyonu, NOTCH sinyal, WNT, VEGF sinyal

2.13. Hsa-miR-146a-5p

İnsan genomu iki miR-146 (miR-146a ve miR-146b) içerir. MiR-146a beşinci kromozom üzerindeki LOC285628 geninde bulunur (Taganov et al., 2006). Hematopoetik kök hücrelerde eksprese olan miR-146a, esas olarak inflamasyondaki rolü ve immün yanıtı azaltmasıyla bilinmektedir. NF-κB aktivasyonunu upregüle eden proteinleri hedefleyerek immün yanıtı azaltabilmektedir (Kagele & O'Connell, 2015). Bir çok çalışmada miR-146a, CARD10 ekspresyon inhibisyonunu hedefleyerek inflamasyonu inhibe edebildiğini göstermiştir. CARD proteinleri NF-κB'yi aktive ve inflamatuvar yanıtı indüklemekte işlev görür.

MiR-146a ekspresyonu abdominal aort anevrizmal (AAA) hastalarında inflamatuvar faktörlerle korele olduğu bildirilmiştir. MiR-146a vasküler endotel hücrelerinde MMP-9 ve MMP-2 seviyeleri ile ilişkilidir (Şekil 2.9.). Western blot çalışmasında miR-146a'nın

ekspresyon inhibisyonu, MMP-2 ve MMP-9 proteinlerinin ekspresyonunu upregüle ettiğini göstermiştir (C. Zhang et al., 2020).



Şekil 2.9. MiR-146a. MiR-146a, AAA'lı hastalarda NF-κB yolağıyla CARD10'u hedefleyerek inflamasyonu inhibe eder (C. Zhang et al., 2020).

MiR-146a düzensizliği, inflamatuvar yanıtı modüle ederek çok sayıda nöropatolojik durumla ilişkilidir. İntraserebral kanamadan 48 saat sonra miR-146a'nın perihematomal alanda upregülasyon ekspresyonu ve anti-inflamatuvar potansiyel gösterdiği bildirilmiştir (Kashif et al., 2021). MiR-146a-5p'nin yüksek ekspresyonu İA tanılı hastalarında kanama, Hunt-Hess skoru ve kötü sağkalım ile ilişkilidir. (H. L. Zhang et al., 2018). Anevrizma ilerlemesi ve kanaması ile ilişkili olabilecek genler, biyolojik süreçler ve yollar Tablo 2.10.'da gösterilmiştir.

Tablo 2.10. MiR-146a-5p ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yollar

Hedef Genler	Biyolojik Süreçler	Yolaklar
<i>TRAF6, TLR2, CXCR4, FAS, IRAK1, MDM2, PMAIP1, CDKN1A, PTGS2, RAC1, RBL1, VEGFA</i>	İmmün yanıt, NF-κB kinaz aktivitesi, interlökin regülasyonu, apoptoz, sinyal iletimi, sitokin sinyal yolak regülasyonu, MAPK aktivitesinin regülasyonu, düz kas hücre proliferasyonu, hipoksiye hücresel yanıt, hücre adezyonu, Wnt sinyal yolağının regülasyonu, MMP sekresyon	İnterlökin sinyal, inflamasyon, sinyal iletimi, FasL/CD95L sinyal, apoptoz, kemokin reseptör yolağı

2.14. Hsa-miR-1297

MiR-1297, 17 nükleotid'den oluşan küçük bir RNA partikülüdür ve kromozom 13q14.3'te lokalizedir (Alizadeh-Fanalou et al., 2021). MiR-1297, gen ekspresyonunun modülasyonu, hücre döngüsü, hücre proliferasyonu ve sinyal iletimi dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte yer almaktadır. MiR-1297, çeşitli tümör dokularında düzensizdir. Bu miRNA, farklı yollarla hücre fonksiyonu etkileyebilir. MiR-1297, testiküler germ hücreli tümörlerde PTEN/PI3K/AKT sinyal yolağı yoluyla büyümeyi düzenleyerek Meg3 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Gliomada HMGA1'i hedefleyerek proliferasyonu ve invazivliği önleyebilir. Prostat kanserinde yeni tanımlanmış bir miR-1297/AEG-1/Wnt sinyal yolağı incelenmiştir. MiR-1297'nin ekspresyonu, aSAK şiddeti ve kötü klinik sonuç ile ilişkilendirilmiştir. MiR-1297, aSAK'ın patofizyolojik mekanizmasına katıldığı öne sürülmüş, bu nedenle aSAK'ın tanı, şiddeti ve prognozunun tahmini için potansiyel biyobelirteç olabileceğini bildirmişlerdir (N. S. Lai et al., 2017; Sheng, Lai, et al., 2018). Anevrizma ilerlemesi ve kanaması ile ilişkili olabilecek genler, biyolojik süreçler ve yollar Tablo 2.11.'da gösterilmiştir.

Tablo 2.11. MiR-1297 ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yollar

Hedef Gen	Biyolojik Süreç	Yollar
PTEN	Anjiyogenez, apoptoz, hücre proliferasyonu, endotel hücre göçü, hücre döngüsü regülasyonu, ERK1 ve ERK2 kaskadların regülasyonu, hipoksiye hücresel yanıt, vasküler düz kas hücre proliferasyonunun regülasyonu	PI3K/AKT, inflamasyon, sinyal iletimi

2.15. Hsa-miR-27b-3p

MiR-27b, insanda miR-23b/miR-27b kümesine ait, 9q22.1 kromozomunda C9orf3 geninde lokalize intragenik bir miRNA'dır. İnterlökin-6 (IL6), C-C motifi, ligand 18 (CCL18) ve IFN- γ gibi sitokinler, miR-27b'nin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Ding et al., 2017). MiR-27b-3p, mikroglial aktivasyonunu indükleyerek IL-6, IL-1 β ve TNF-a ekspresyon artışı ve hücre apoptozunu düzenleyebilir (L. Li et al., 2021).

MiR-27b, sırasıyla anti- ve pro-anjiyogenik faktörler tarafından kontrol edilen ve bir birine zıt olan regresyon ve genişleme olmak üzere iki vasküler süreci entegre eder. Bazı çalışmalar, miR-27b'nin birçok antianjiyogenik genlerini hedefleyerek bir anjiyogenez promotörü olarak işlev gördüğünü doğrulamıştır. MiR-27b, anjiyogenez, dallanma ve ayrıca uygun arteriyel-venöz ayrımını düzenler ve *in vitro* olarak endotel hücrelerin itmesini inhibe eder. *In vivo* olarak miR-27b perfüze kan damarlarının sayısını artırır ve embriyonik kan damar oluşumunun korunmasında katkıda bulunur. MiR-27b, endotel hücrelerde, akciğer ve kalp gibi yüksek oranda vaskülarize dokularda eksprese olur. Bu nedenle endotel hücre işlevinde ve damar sisteminde potansiyel bir rol oynadığı düşünüyor. MiR-27b, VEGF'ye yanıt olarak Sprouty2, Sema6A ve Sema6D'yi hedefleyerek ve doğrudan inhibe ederek endotel hücre proliferasyonunu ve göçünü düzenler ve anjiyogenezi artırır (Ding et al., 2017). MiR-27b-3p ekspresyonu aSAK'ta klinik sonuçla ilişkilendirilmiştir. (Supriya et al., 2020). Anevrizma ilerlemesi ve kanaması ile ilişkili olabilecek genler, biyolojik süreçler ve yollar Tablo 2.12.'da gösterilmiştir.

Tablo 2.12. MiR-27b-3p ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yollar

Hedef Gen	Biyolojik Süreç	Yollar
<i>PPARG</i> , <i>FOXO1</i> , <i>VEGFC</i>	Hücre proliferasyonu, apoptoz, immün yanıt, sinyal iletimi, hipoksiye hücresel yanıt, vasküler düz kas hücre proliferasyonu, kollajen biyosentetik sürecinin regülasyonu, kan damar gelişimi, oksidatif strese yanıt, otofaji, anjiyogenez, kan damarında endotel hücre göçünün regülasyonu	İnflamasyon, MAPK, PI3K/AKT sinyal yolağı, PTEN, intrasellüler sinyal

2.16. Hsa-miR-502-5p

MiRNA ailesinin bir alt tipi olan miR-502-5p, promotör bölgelerinde potansiyel p53 bağlanma bölgelerini içeren miRNA adayları arasındadır. Translasyonu inhibe etmek için Rab1B mRNA'nın 3'-UTR'sine bağlanabilmektedir (Sheng, Fang, et al., 2018). MiR-502-5p, hücre döngüsü ilerlemesinin modülasyonu, hücre proliferasyonu ve sinyal iletimi dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte rol oynar. Farklı hastalıklarda farklı genlerleri

hedefleyerek işlev görür. Çalışmalarda miR-502-5p ekspresyonu, apoptozu arttırabileceği ve tümör hücrelerin proliferasyonunu inhibe edebileceğini göstermiştir.

MiR-502-5p kanserin başlaması ve ilerlemesinde rol oynar. Anevrizmada miR-502-5p, NF-κB sinyal yolağını inhibe ettiğini ve TRAF2'yi hedefleyerek IL-1b kaynaklı kondrosit hasarını önleyebileceği bildirilmiştir. MiR-502-5p'nin overekspresyonu, IL-1b ile indüklenen kondrositlerde anti-apoptotik, anti-katabolik ve anti-inflamatuvar etkilere neden olur (N. S. Lai et al., 2017; Sheng, Fang, et al., 2018). MiR-502-5p seviyesi SAK oluşumu, gelişimi ve onarım ilerlemesine katkıda bulunur. Ayrıca nörolojik şiddeti ve klinik sonuç ile ilişkilendirilmiştir (N. S. Lai et al., 2017). Anevrizma ilerlemesi ve kanaması ile ilişkili olabilecek genler, biyolojik süreçler ve yollar Tablo 2.13.'da gösterilmiştir.

Tablo 2.13. MiR-502-5p ile ilişkili hedef genler, biyolojik süreçler ve yollar

Hedef Gen	Biyolojik Süreç	Yollar
<i>TRAF6, IFI27</i>	İmmün yanıt, NF-κB kinaz aktivitesi, interlökin üretiminin regülasyonu, apoptoz, sinyal iletimi	İnterlökin sinyal, inflamasyon, sinyal iletimi

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Rüptüre olan ve rüptüre olmayan anevrizma tanılı olgulardaki miRNA ekspresyon profillerinin vakaların klinik özellikleriyle beraber değerlendirildiği çalışmamız, Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi ile Nöroloji Anabilim Dalları işbirliğinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız ESOGÜ BAP TCD-2021-1737 nolu proje kodu ile desteklenmiştir.

3.1. Araştırma Grubu

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı ve Nöroloji Anabilim Dalı tarafından intrakranial anevrizma tanısı alan hastaların ve kontrol grupların periferik kan ve BOS örnekleri dahil edilmiştir. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile seçilen aday sirküle miRNA ekspresyonları ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler seksiyonunda analiz edilmiştir. Çalışma için ESOGÜ Klinik Araştırmalar Etik kurulunun, 31.03.2021 tarih ve 41 numaralı kararıyla onay alınmıştır.

Çalışmamızın güç analizleri ile yüksek güvenilirliği olan verilere ulaşabilecek hasta ve kontrol gruplarının sayılarını belirlemek için Lopes ve arkadaşlarının verileri baz alınmıştır (Lopes et al., 2018). Hasta ve kontrol grupları için güven aralığı yaklaşımı ile yapılan güç analizinde tip 1 hata oranı %5 ve orta düzeyde etki büyüklüğü (EB=0.5) göz önünde bulundurularak yapılan hesaplama sonucunda, araştırma grubu için gerekli örnek sayısının en az 32 olması gerektiği saptanmıştır. Güç analizinde PASS 11 programı kullanılmıştır.

Çalışmamız, anevrizma tanılı olgu ve kontrol bireyleri temelinde üç grup olarak planlanmıştır. Gruplar aşağıda detaylandırılmıştır:

1. Grup (Olgu grubu 1): Subaraknoid kanama geçirmeyen 12 hastanın periferik kan örnekleri. Hastalarda anevrizma varlığı, serebral diagnostik anjiyografi, tomografi anjiyografi veya MR anjiyografi ile tespit edilmiştir.
2. Grup (Olgu grubu 2): Subaraknoid kanama geçiren 12 hasta. Anevrizmanın beşinci gününde 12 hastadan periferik kan ve BOS örnekleri alınmıştır. Hastalarda anevrizma

varlığı, serebral diagnostik anjiyografi, tomografi anjiyografi veya MR anjiyografi ile tespit edilmiştir.

Olgu grubu (BOS): Örneklem gurubunda beşinci günde BOS örneğinin alınması, bu çalışma için hastada yapılan ek bir işlem değildir. Anevrizmal subaraknoid kanama sonrası hastaya (genelde operasyon sırasında) lomber drenaj takılması rutin bir uygulamadır. Lomber drenaj ile BOS drenajı yapılarak kanamanın temizlenmesi, vazospazm, hidrosefali gibi komplikasyonların gelişiminin önlenmesi amacıyla rutin olarak uygulanmaktadır. Ek bir sorunu olmayan hastalarda beşinci gün drenaj çekilmiştir. Çalışmada analiz edilen BOS örnekleri de bu kapsamda alınmıştır.

3. Grup (Kontrol grubu): 7 sağlıklı bireyin periferik kan ve 7 normal basınçlı hidrosefali bireyin BOS örneklerinden oluşmuştur.

Kontrol grubu (BOS): Kontrol grubu olarak, normal sağlıklı bireylerden BOS alınamayacağı için, bu çalışmada kontrol grubu için alınması planlanan BOS, idiopatik normal basınçlı hidrosefali nedeniyle ameliyat edilecek hastalarda ameliyat sırasında alınmıştır. İdiopatik normal basınçlı hidrosefali, erişkinlerde görülen, travma, enfeksiyon, kanama gibi bilinen bir nedene bağlı olmayan artmış ventriküler hacim ile birlikte olan psikomotor bozukluklar (demans), yürüme bozukluğu ve dengesizlik, idrar inkontinansı ile tanımlanan bir hastalıktır. Hastalığın temel cerrahi tedavisi seçenekleri ventrikülo peritoneal shunt, lumboperitoneal shunt ve endoskopik ventriküostomidir. Beyin ve Sinir cerrahisi kliniğinde idiopatik normal basınçlı hidrosefali tedavisi rutin olarak uygulanmaktadır. Yapılan ameliyatlarda BOS basıncını ölçmek ve dolayısıyla uygulanacak shunt pompa basıncı ayarlamak için yaklaşık 5-20 cc BOS kullanılmaktadır ve alınan BOS atılmaktadır. Bu çalışmada kontrol grubu olarak atılan bu BOS örneği kullanılmıştır. Dolayısıyla hastalara ek bir tıbbi girişim yapılmamış, daha fazla BOS drene edilmemiştir.

Çalışma kapsamında olgu ve kontrol gruplarının oluşturulmasında kullanılan dahil edilme/edilmeme kriterleri aşağıda listelenmiştir:

Hasta grubuna ilişkin örneklerin dahil edilme kriterleri:

1. 18-80 yaş arasında anevrizma tanısı alan ve çalışmaya katılmayı kabul eden hastalar.

Hasta grubu dahil edilmeme kriterleri:

1. Travmatik, mikotik ya da dissekan anevrizma varlığı
2. Kan beyin bariyerini bozacak ek hastalık, kemoterapi ya da travma hikayesinin olması
3. Altta yatan hastalığın (organ yetmezlikleri, kanser, diyabet, bağışıklık baskılayan hastalıklar, karaciğer ve böbrek fonksiyon bozuklukları olan hastalar) bulunması

Kontrol grubu dahil edilme kriterleri:

Muayenede serebral anevrizma bulgusu, nörolojik hastalığı, aSAK veya rüptüre olmamış anevrizma öyküsü ve anevrizma açısından pozitif aile öyküsü olmayan, kronik/sistemik hastalığı olmayan bireyler

Bu çalışmada İA tanı ve prognozunda etkili sirküle miRNA biyomarkerlarını belirlemek amacıyla literatürde yapılan ilgili çalışmalar taranarak, aday sirküle miRNA'lar seçilmiştir. Bu sirküle miRNA'lar; miR-29a, miR-126, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-1297, miR-27b-3p ve miR-502-5p olarak belirlenmiştir. Olgu ve kontrol gruplarında bu sekiz sirküle miRNA'nın ekspresyonlarını belirlemek amacıyla RT-PCR yöntemi kullanılmıştır.

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan aletler

-20°C buzdolabı (Arçelik)

-80°C buzdolabı (Panasonic MDF-U5386S-PE, Ultra- Low Tempature Freezer, Panasonic Healthcare Co, Ltd)

+4°C buzdolabı (Arçelik)

CFX19 Real-Time System (BIO-RAD, C1000 Touch Thermal Cyclers, Bio-Rad Laboratories, Inc)

Soğutmalı santrifüj (AllegraX-30R Centrifuge, Beckman Coulter)

QIAcube Connect (QIAGEN)

Mikrosantrifüj (ISOLAB/LW5E001778)

Vorteks (Heidolph Reax Control)

Thermal Block (Bio TDB-120 BIOSAN)

Nanodrop spektrofotometre (NANODROP 1000 Spectrophotometer, peQLab Biotechnologie, GmbH)

Qubit 3 Fluorometer (Invitrogen, by Thermo Fisher Scientific)

Mikropipet seti (10-100-1000 µl)

3.2.2. Kullanılan malzemeler

Steril tek kullanımlık eldiven (Beybi, Powder-Free Nitrile Examination Gloves)

Distile su (Thermo Scientific™ Water, Nuclease Free)

%100 etanol (Tarımsal amaçlı etil alkol)

İzopropil alkol

Steril mikropipet uçları (10-100-1000 µl)

Beta Merkaptotanol (M3148 Sigma-Aldrich 2-Mercaptoethanol)

Glikojen (SIGMA, Glycogen from oyster)

PAXgene Blood RNA tüpü (PreAnalytiX, QIAGEN, BD Company)

PAXgene Blood miRNA kit (PreAnalytiX, QIAGEN, BD Company)

miRVANA™ *PARIS™* Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)

96 kuyucuklu PCR plate (LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white)

PCR plate uygun optikal sealing film (LightCycler 480 Sealing Foil)

ABM miRNA ALL-In-One Cdna Synthesis Kit (Cat# G898)

BrightGreen miRNA qPCR Master Mix (Cat# MasterMix-mR)

3.2.3. Kullanılan primerler

U6 (Kontrol) CAT:MPH00001 (Applied Biological Materials, ABM)

hsa-miR-126-3p CAT:MPH01082 (Applied Biological Materials, ABM)

hsa-miR-200a-3p CAT:MPH02296 (Applied Biological Materials, ABM)

hsa-miR-451a CAT:MPH02756 (Applied Biological Materials, ABM)

hsa-miR-27b-3p CAT:MPH02385 (Applied Biological Materials, ABM)

hsa-miR-146a-5p CAT:MPH02204 (Applied Biological Materials, ABM)

hsa-miR-502-5p CAT:MPH01742 (Applied Biological Materials, ABM)

hsa-miR-1297 CAT:MPH01130 (Applied Biological Materials, ABM)

hsa-miR-29a-3p CAT:MPH01310 (Applied Biological Materials, ABM)

3.3. Yöntem

3.3.1. Materyal alımı

Anevrizma olgularının tanısı ve kontrol grubunu oluşturacak örneklerin seçimi, alınması Beyin ve Sinir Cerrahisi ve Nöroloji Anabilim Dallarından araştırma ekibi içerisinde yer alan klinisyenler tarafından yapılmıştır. Bütün araştırma ve kontrol grubu bireyleri ile görüşülmüş, çalışmanın amaç ve aşamaları anlatılarak kabul edenlerden onam formu alınmıştır.

3.3.2. Periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonu

Çalışmada İA tanılı olgulardan ve kontrol grubu bireylerinden 2.5 ml periferik kan örneği PAXgene Blood RNA tüpler (PreAnalytiX, QIAGEN, BD Company) içerisine alınmıştır. Kan izolasyonunda PAXgene Blood miRNA kiti kullanılmıştır. Kan hücrelerinin tam lizisini sağlamak için PAXgene Blood RNA tüpü kan alındıktan sonra protokole göre en az 2 saat boyunca oda sıcaklığında (15-25 derece) inkübe edilmiştir.

1. PAXgene Blood RNA tüpü dışarı doğru açılır rotor kullanılarak 10 dakika boyunca 4000 x g hızda santrifüj edilmiştir.
2. Süpernatant atıldıktan sonra pellete 4 ml RNaz-free water eklenip, tüp yeni bir sekonder Hemogard kapak (PreAnalytiX, QIAGEN) ile kapatılmıştır.
3. Pellet görünür şekilde çözününceye kadar vortekslenip, 10 dakika 4000 x g hızda santrifüj edilmiştir. Süpernatantın tamamı atılmıştır.
4. 350 µl Buffer BM1 (resüpsansiyon tamponu) eklenip, pellet görünür şekilde çözününceye kadar vortekslenmiştir.

5. Örnek 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne pipetlenmiştir. Üzerine 300 µl Buffer BM2 (bağlama tampon) ve 40 µl proteinaz K eklenmiştir. Ardından 5 saniye vortekslenip, sallayıcı inkübatörde 10 dakika 55°C'de 1000 rpm hızda inkübe edilmiştir.
6. Örnek doğrudan, 2 ml'lik bir işleme tüpüne yerleştirilmiş PAXgene Shredder spin kolonuna aktarılıp, maksimum hızda (20.000 x g) 3 dakika santrifüj edilmiştir.
7. PAXgene Shredder spin kolonundan akışın tümü yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
8. Tüpe 700 µl izopropanol (% 100, saflık derecesi p.a.) eklenip, vortekslenmiştir.
9. 2 ml'lik işleme tüpüne yerleştirilmiş RNA spin kolonuna 700 µl örnek pipetlenmiş ve 8000 x g hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolonu yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne yerleştirilip, geri kalan örnek için bu aşama tekrarlanmıştır.
10. 350 µl Buffer BM3 (yıkama tamponu 1) spin kolonuna eklenip, 15 saniye 8000 x g hızda santrifüj edilmiştir. Akış kısmını içeren eski işleme tüpü atılmıştır ve spin kolonu yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne yerleştirilmiştir.
11. 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünde 70 µl Buffer RDD'ye (DNA parçalama tamponuna) 10 µl DNase I stok solüsyonu eklenmiştir. Ardından hafifçe vurularak karıştırılmıştır.
12. DNase I inkübasyon karışımı (80 µl) doğrudan spin kolonu membranına eklenip, tezgah üzerinde (20–30°C) 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
13. Spin kolonuna 350 µl Buffer BM3 eklenip, 8000 x g hızda 15 saniye santrifüj edilmiştir. Spin kolonu yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne yerleştirilmiştir.
14. Spin kolonuna 500 µl Buffer BM4 (yıkama tamponu 2) eklenip, 8000 x g hızda 15 saniye santrifüj edilmiştir. Spin kolonu yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne yerleştirilmiştir.
15. Spin kolonuna 500 µl daha Buffer BM4 eklenip, 8000 x g hızda 2 dakika santrifüj edilmiştir.
16. Spin kolonu yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne yerleştirilip, 8000 x g hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.

17. Spin kolonunu 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirip, 40 µl Buffer BR5'i (elüsyon tamponunu) doğrudan spin kolonu membranına pipetlenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 1 dakika 8000 x g hızda santrifüj edilmiştir.
17. Elüat 65°C'de inkübe edilip, inkübasyondan sonra hemen buz üzerinde soğutulmuştur.
18. İzole edilen total RNA'ların spektrofotometre (NanoDrop) cihazıyla ölçümleri yapılmıştır.
19. RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Saf RNA için A260/A280 oranı 1.9–2.1 aralığında olması gerekmektedir.

3.3.3. BOS örneklerinden total RNA izolasyonu

BOS örneklerinde kontamine kan hücrelerini yok etmek amacıyla örnek +4°C'de 2000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Kan pelletini bozmadan BOS materyali tüpten pipetle alınmıştır. Hemen izolasyon yapılmadığı durumlarda alikotlanarak -80°C'de saklanmıştır. RNA izolasyonunda *miRVANA™* *PARIS™* Kiti kullanılmıştır.

1. Oda sıcaklığında 625 µl BOS örneğine 625 µl 2X Denatürasyon Solüsyonu eklenmiştir.
2. 1250 µl hazırlanan lizata (BOS+2X Denatürasyon Solüsyonu), 1250 µl Fenol-Kloroform eklenip, 30-60 saniye vortekslenmiştir.
3. Faz ayırımını sağlayabilmek amacıyla ≥ 10000 x g hızında 5 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Sulu (üst) faz, alt fazlarını bozmadan dikkatlice alınıp, yeni bir tüpe aktarılmıştır.
5. Sulu faza 4 µl glikojen eklenmiştir.
6. Sulu faza 1.25 hacim %100 etanol eklenip, iyice vortekslenmiştir (600 µl sulu faza, 750 µl etanol).
7. Filtre tüpüne 700 µl Lizat/etanol karışımı eklenip, 30 saniye 10000 x g hızda santrifüj edilmiştir. Akış kısmı boşaltılmıştır. Geri kalan örnek için bu aşama tekrarlanmıştır.
8. Filtre tüpüne 700 µl miRNA Wash Solution 1 eklenip, 15 saniye 10000 x g hızda santrifüj edilmiştir. Akış kısmı boşaltılmıştır.
9. Filtre tüpüne 500 µl Wash Solution 2/3 eklenip, 15 saniye 10000 x g hızda santrifüj edilmiştir. Akış kısmı boşaltılmıştır.
10. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.

11. Filtrede kalan sıvıyı boşaltmak için 1 dakika 10000 x g hızda santrifüj edilmiştir.
12. Filter tüpü 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilip, önceden 95°C'de ısıtılmış elüsyon solüsyonundan 20 µl filtreye eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika bekledikten sonra 30 saniye 10000 x g hızda santrifüj edilmiştir.
13. İzole edilen total RNA'lardan, miRNA'ların konsantrasyonunu ölçmek için Qubit cihazı kullanılmıştır.
14. RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

BOS örneklerinde RT-PCR için miRNA konsantrasyonu 0.3-5 ng aralığında olması idealdir.

3.3.4. cDNA sentezi

Periferik kan ve BOS materyalinden elde edilen RNA'lar nanodrop ve Qubit cihazları ile ölçümleri yapılmıştır. Cihazda ölçülen değerler ng/ µl cinsinden olduğu için reaksiyon 20 ng'dan kurulur ve gerekli hesaplamalar yapılır.

Her bir örnek için:

Hesaplama (Kan örnekleri)

1µl	(cihazda ölçülen değer) ng
X	250 ng (Kandan izole edilen RNA için)

$$X = 250 / (\text{cihazda ölçülen değer}) \mu\text{l}$$

Hesaplama (BOS örnekleri)

1µl	(cihazda ölçülen değer) ng
X	5 ng (BOS' tan izole edilen RNA için)

$$X = 5 / (\text{cihazda ölçülen değer}) \mu\text{l}$$

cDNA Standard Reaksiyon

2X miRNA cDNA Synthesis SuperMix -----10 µl

Enzyme Mix -----2 µl

Nuclease-free H₂O----- ?

RNA örneği----- ?

Bir örnek başına Mix karışımı totalde 20 µl olduğundan her bir örneğin RNA'sı eklenerek total hacim 20 µl'den çıkarılır. Su miktarları bulunur.

Aşağıdaki Tablo 3.1.'de belirtilen data sheete göre sıcaklık ve süre değerleri cihaza girilir.

Tablo 3.1. cDNA sentez PCR koşulları

Ayarlar	Aşama I	Aşama II	Aşama III	Aşama IV
Sıcaklık	37°C	50°C	85°C	4°C
Süre	30 dakika	15 dakika	5 dakika	∞

Örnekler 4°C adımına geldiğinde buz üzerine alınır.

3.3.5. Ekspresyon analizi

cDNA eldesi yapılan örneklerde ekspresyon analizleri CFX-96 Real-Time PCR (BIO-RAD, C1000 Touch Thermal Cycler) cihazında gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek, belirlenen sekiz sirküle miRNA ve U6 (kontrol) açısından değerlendirilmeye alınmıştır. MiRNA ekspresyon durumları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hesaplama yöntemine göre yapılmıştır. Ekspresyon analizinde kullanılan primer dizileri Tablo 3.2.'de gösterilmiştir. Ekspresyon çalışmasında izlenen protokol Tablo 3.3.'te anlatıldığı gibi her bir örnek için 10 µl miks hazırlanmış ve 96 kuyucuklu plate konularak üzeri sealing ile kapatılmıştır. Sonrasında Tablo 3.4.'te gösterildiği şekilde PCR koşulları cihaza tanımlanarak reaksiyon başlatılmıştır. RT-PCR çalışması 40 döngü tekrarı ile yapılmıştır.

Tablo 3.2. Kullanılan primer dizileri

MiRNA Adı	Forward Primer Dizisi (5'→3')	Reverse Primer Dizisi (5'→3')
hsa-miRNA-126-3p	UCGUAC CGUGAGUAAUAAUGCG	CAUUAU UACUUUUGGUACGCG
hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	ACCGAUUUCAGAUGGUGCUAUU
hsa-miR-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	AUCGUUACCAGACAGUGUUAUU
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU	CUCAGUAAUGGUAACGGUUUUU
hsa-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	AACCCAUGGAAUUCAGUUCUCA
hsa-miR-1297	UUCAAGUAAUUCAGGUG	CCUGAAUUACUUGAAUU
hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGC
hsa-miR-502-5p	AUCCUUGCUAUCUGGGUGCUA	GCACCCAGAUAGCAAGGAUUU

Tablo 3.3. Real-Time PCR reaksiyon kurulum bileşenleri

Reaktif	Miktar (µl)
BrightGreen miRNA qPCR Master Mix	5
cDNA	2
Primerler (forward+reverse)	0.7
Nükleaz free water	2.3 µl
Toplam miktar	10

Tablo 3.4. RT-PCR protokolü

Sıcaklık	Süre (dakika/saniye)	Döngü Tekrarı
95°C	10 dk	40
95°C	10 sn	40
60°C	20 sn	40
72°C	30 sn	40

3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi IBM SPSS 21 paket programı ile yapılmıştır. Nicel değişkenler ortalama, standard sapma ve ortalama standard hata olarak gösterilmiştir. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılan değişkenlerde iki grup karşılaştırılması t-testi ile, dağılmayan durumlarda ise Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. SPSS programı ile Receiver operating characteristic (ROC) eğrileri oluşturulmuş ve her bir aday miRNA için eğri altında kalan alan (AUC), spesivite ve sensivite değerlendirilmiştir. Analiz sonucu istatistiksel olarak $p<0,05$ olan durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya ESOĞÜ Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı ile Nöroloji Anabilim Dalına başvuran İA tanısı almış 24 hasta ve 14 kontrol dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 24 İA tanılı olgunun 12'si SAK geçiren grup olup anevrizmanın beşinci gününde bu olgulardan alınan periferik kan ve BOS örnekleri, SAK geçirmeyen 12 hastanın periferik kanı olmak üzere İA grubuna ait toplamda 36 (24 periferik kan, 12 BOS) örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubunda herhangi bir nörolojik ve kronik hastalığı olmayan 7 bireyin periferik kanı ve farklı nedenlerle tedavi amaçlı BOS aspirasyonu yapılan 7 bireye ilişkin BOS örnekleri olmak üzere toplam 14 örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Periferik kan ve BOS olmak üzere toplam 50 anevrizma ve kontrol grubu örneklerinde, anevrizma prognozunda etkili olabileceği öngörülen sekiz sirküle miRNA'nın ekspresyon profilleri değerlendirilmiştir. Prognostik belirteç adayı olarak analiz edilen sirküle miRNA'lar sırasıyla; miR-126, miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-1297, miR-27b-3p ve miR-502-5p'tir. Referans miRNA geni olarak U6 kullanılmıştır. RT-PCR yöntemi ile ekspresyon çalışmasına $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hedef miRNA'lar referans gene kıyaslanarak ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Amacımıza yönelik seçilen gruplar arasında kat değişimi (Fold change) hesaplaması yapılarak, ekspresyon farklılıkları belirlenmiştir. MiRNA ekspresyon seviyeleri hastaların klinik bulgularıyla birlikte değerlendirilmiştir.

4.1. Subaraknoid Kanama Geçiren Olgu Grubuna Ait Klinik Özellikler

Çalışmamıza dahil edilen 12 SAK geçiren olgunun altısı kadın, altısı erkektir. Olguların yaş ortalaması 55,75 (46-78) idi. Bu grupta ikinci olgunun periferik kanından ve 12. Olgunun BOS örneğinden RT-PCR çalışmasında herhangi bir ekspresyon alınmamıştır. SAK geçiren olgu grubuna ait klinik özellikler Tablo 4.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. SAK geçiren olgu grubuna ait klinik özellikler

Olgu Numarası	Cinsiyet	Yaş	Anevrizma Lokasyonu	Fisher Skoru	Hunt-Hess Skoru	Modifiye Rankin Skalası
1	Kadın	55	Acom anevrizması	4	2	1
2	Kadın	49	Sağ İKA Pcom segment	4	2	1
3	Kadın	46	Sol İKA anevrizması	3	2	5
4	Kadın	78	Acom anevrizması (2 adet)	3	2	2
5	Kadın	51	Sağ İKA tepe ve sol İKA supraklinoid anevrizması	4	2	4
6	Kadın	60	Acom anevrizması, sağ OSA (2 tane), sol OSA (2 tane) anevrizması	3	3	1
7	Erkek	51	Sağ İKA supraklinoid segment, sağ OSA bifurkasyon, sol İKA supraklinoid blister, sol OSA bifurkasyon anevrizması	4	2	1
8	Erkek	48	Acom anevrizması	2	2	1
9	Erkek	57	Sol OSA anevrizması	4	5	6
10	Erkek	46	Acom anevrizması	3	1	1
11	Erkek	69	Acom anevrizması	2	2	1
12	Erkek	59	Acom anevrizması	3	2	6

*Acom=Anterior komünikan arter, İKA=İnternal karotid arter, Pcom=Posterior Komünikan arter, OSA=Orta serebral arter

SAK geçiren hastaların periferik kan ve BOS örneklerinde saptanan miRNA ekspresyon profilleri olguların klinik özellikleri temel alınarak hafif ve şiddetli klinik gösteren hastalar olarak gruplandırılarak karşılaştırılmıştır. Tablo 4.2.'de gösterildiği gibi Fisher skoru değerlendirilmesinde skor 1-3 ve 4 arasında, Hunt-Hess skor değerlendirilmesinde skor 1-2 ve 3-5 arasında ve modifiye rankin skalasında skor 1 ve 2-6 arasında prognoz karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.2. Hafif ve şiddetli SAK geçiren hastaların klinik bilgileri

Klinik Skor'lar	Klinik Şiddeti	Hasta Sayısı
Fisher Skoru 1-3	Daha iyi klinik sonuç	7
Fisher Skoru 4	Kötü klinik sonuç	5
Hunt-Hess Skoru 1-2	SAK şiddeti az	9
Hunt-Hess Skoru 3-5	SAK şiddeti yüksek	3
Modifiye Rankin Skalası 1	İyi klinik sonuç	7
Modifiye Rankin Skalası 2-6	Kötü klinik sonuç	5

4.2. Subaraknoid Kanama Geçirmeyen Olgu Grubuna Ait Klinik Özellikler

Çalışmamıza dahil edilen 12 SAK geçirmeyen olgunun yedisi kadın, beşi erkektir. Olguların yaş ortalaması 50,33 (29-79) idi. SAK geçirmeyen olgu grubuna ait klinik özellikleri Tablo 4.3.'te verilmiştir.

Tablo 4.3. SAK geçirmeyen olgu grubuna ait klinik özellikler

Olgu Numarası	Cinsiyet	Yaş	Anevrizma Lokasyonu
1	Kadın	79	Sağ temporal kitle
2	Kadın	67	Sağ İKA anevrizması
3	Kadın	48	Sağ İKA supraklinoid segment anevrizması
4	Kadın	34	Sol İKA anevrizması
5	Kadın	50	Sağ İKA komünikan segment, sağ OSA anevrizması
6	Kadın	35	Sağ İKA komünikan segment anevrizması
7	Kadın	73	Bilateral OSA anevrizması
8	Erkek	29	Sağ İKA oftalmik arter çıkışında anevrizma
9	Erkek	45	Sağ İKA tepe, sağ OSA bifurkasyon, sol İKA anevrizması
10	Erkek	53	Acom anevrizması
11	Erkek	42	Sol OSA+ASA anevrizması
12	Erkek	49	Acom anevrizması

* İKA=İnternal karotid arter, OSA=Orta serebral arter, Acom=Anterior komünikan arter, ASA=Anterior serebral arter

4.3. Kontrol Periferik Kan Grubuna Ait Bilgiler

Çalışmamızda dahil edilen yedi sağlıklı kontrol bireyin dördü kadın, üçü erkektir (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Kontrol periferik kan grubuna ait bilgiler

Kontrol Numarası	Cinsiyet	Yaş
1	Kadın	49
2	Kadın	63
3	Kadın	61
4	Kadın	57
5	Erkek	58
6	Erkek	57
7	Erkek	85

4.4. Kontrol BOS Grubuna Ait Bilgiler

Çalışmamızda dahil edilen yedi kontrol BOS bireyin dördü kadın, üçü erkektir (Tablo 4.5.).

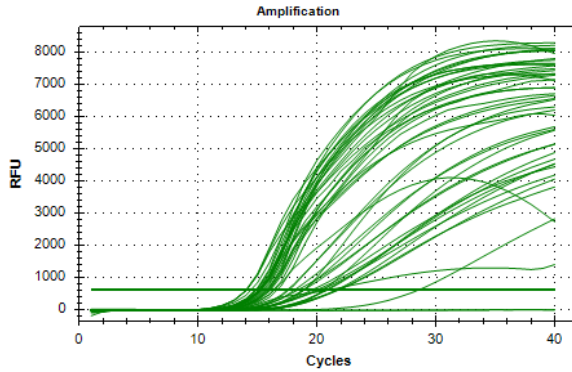
Tablo 4.5. Kontrol BOS grubuna ait bilgiler

Kontrol Numarası	Cinsiyet	Yaş
1	Kadın	81
2	Kadın	56
3	Kadın	78
4	Kadın	59
5	Erkek	78
6	Erkek	55
7	Erkek	1

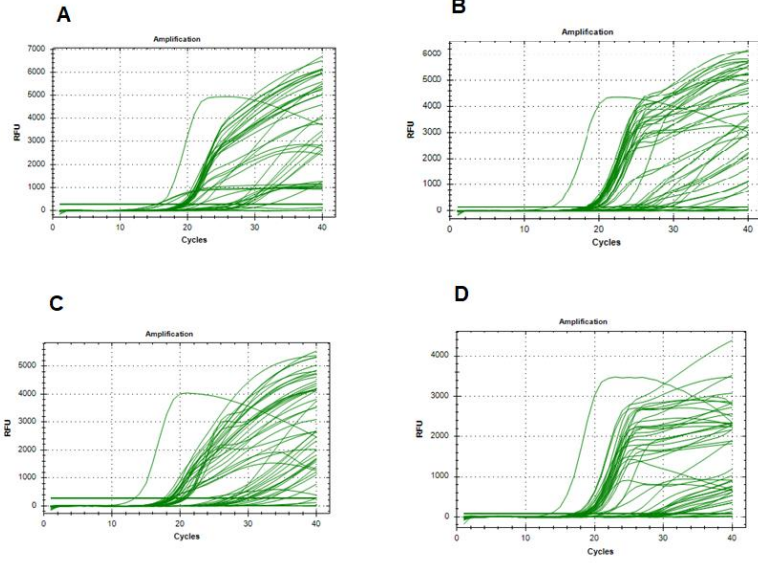
4.5. MiRNA Ekspresyon Analizine Ait Bulgular

Çalışmaya ESOGÜ Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı ve Nöroloji Anabilim Dalına başvuran ve İA tanısı alan 12 SAK geçiren hastadan anevrizmanın beşinci gününde alınan periferik kan ve BOS, 12 SAK geçirmeyen hastadan kan ve nörolojik olarak patolojik bir bulgusu olmayan 14 kontrol bireyden alınan periferik kan ve BOS örneklerinden (toplam 50 örnek) RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, örneklerden elde edilen cDNA'lar aracılığıyla miRNA ekspresyon profilleri CFX-96 Real-Time PCR cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Kontrol gen olarak U6 kullanılmıştır.

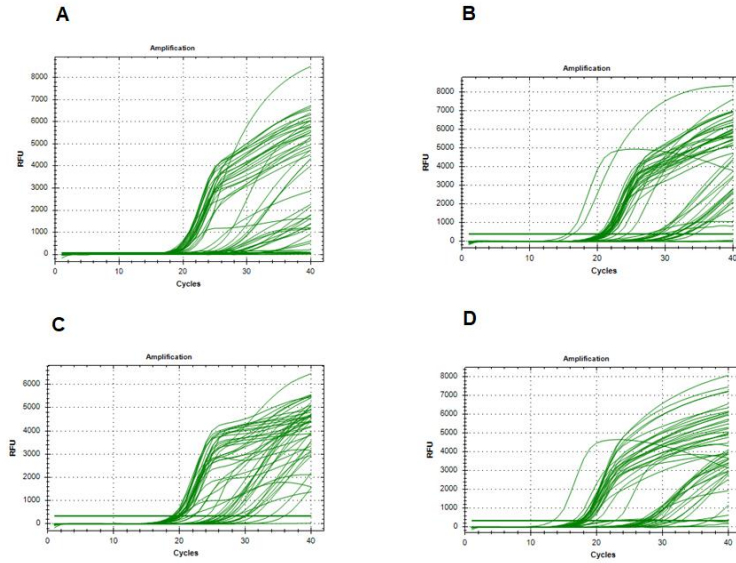
RT-PCR reaksiyonu sonrasında, SAK geçiren grupta ikinci olgunun periferik kanından, 12. olgunun BOS örneğinden ve bir kontrol BOS örneğinden, hem U6, hem de seçilen sekiz prognostik aday sirküle miRNA'ya ilişkin herhangi bir ekspresyon profili alınamamıştır. Bu nedenle çalışmamızdan çıkarılmış olup toplam 47 örnekte ekspresyon seviyeleri ile analizlere devam edilmiştir. RT-PCR sonucu elde edilen piklere ait Ct değerleri miRNA ekspresyonların belirlenmesinde kullanılmış ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak U6 kontrol geni ile kıyaslanarak oransal olarak hesaplanmıştır. U6 ekspresyonları Şekil 4.1.'de, miR-126, miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a ekspresyonları Şekil 4.2.'de ve miR-146a-5p, miR-1297, miR-27b-3p, miR-502-5p ekspresyonlarını gösteren amplifikasyon eğrileri de Şekil 4.3.'te yer almaktadır.



Şekil 4.17. U6 (kontrol) genine ait amplifikasyon görüntüsü



Şekil 4.18. MiRNA ekspresyonların amplifikasyonu 1. A) miR-126 B) miR-29a C) miR-200a-3p D) miR-451a



Şekil 19. MiRNA ekspresyonların amplifikasyonu 2. A) miR-146a-5p B) miR-1297 C) miR-27b-3p D) miR-502-5p

Çalışmamız sonucunda, prognostik sirküle miRNA biyomarkerlerin saptanması amacıyla belirlediğimiz gruplar arasında istatistiksel analizler yapılmış ve kat değişimi hesaplaması yapılarak, ekspresyon farklılıkları belirlenmiştir.

4.5.1. Subaraknoid kanama geçiren ve geçirmeyen vakalarda yaş ve cinsiyetler arasında miRNA ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması

Hem SAK geçiren, hem de geçirmeyen vakalarda, cinsiyetler (kadın ve erkek) arasında miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analiz olarak Mann-Whitney U Testi kullanılmış olup, analiz sonucunda cinsiyetler arasında miRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Hastalar arasında yaş aralığı geniş olduğundan değerlendirmeye tabii tutulamamıştır.

4.5.2. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubu bireylerinin periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.6.'da, SAK geçiren hastalar ile kontrol grubu bireylerinin periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Olgu ve kontrol grubu örneklerinin normal dağılım göstermediklerinin tespit edilmesi nedeniyle istatistiksel analizi Mann-Whitney U Test ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Gruplar arasında ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-1297 ve miR-502-5p düzeyleri farklılıkları iki grup arasında istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur (Bu farklılıklar sırasıyla, $p=0,33$, $p=0,002$, $p=0,014$, $p=0,025$ ve $p=0,044$ şeklinde idi).

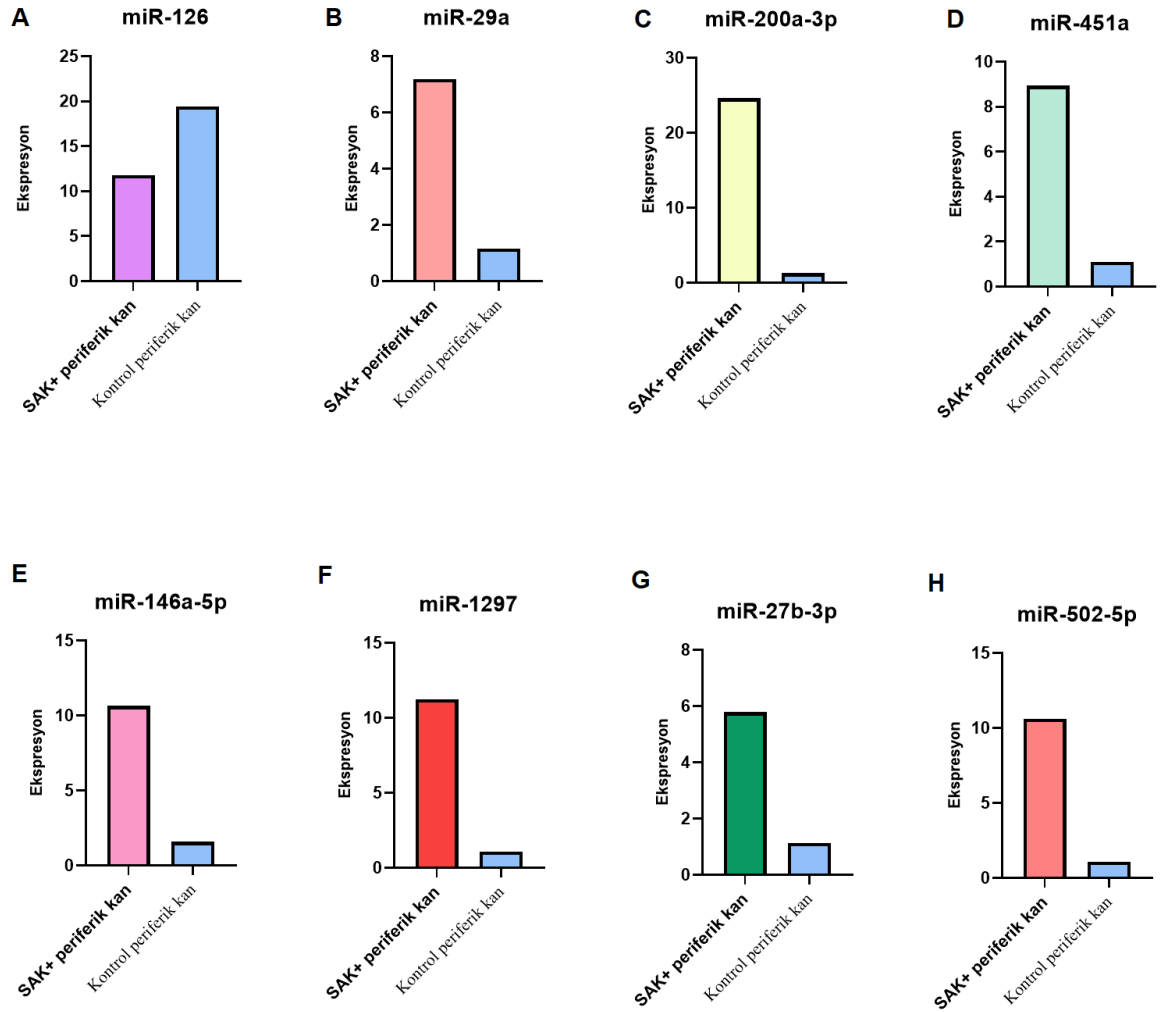
Gruplar arasında gerçekleştirilen kat değişim hesaplamaları Şekil 4.4.'te gösterilmektedir. SAK geçiren hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırılmasında, istatistiksel olarak anlamlı olan beş sirküle miRNA değerlendirildiğinde, SAK hastalarında miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-1297 ve miR-502-5p ekspresyon düzeylerinin kontrollere göre artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların kat artışları sırasıyla; 6.22, 19.66, 8.93, 11.24 ve 10.60 olarak saptanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan diğer miRNA'lardan miR-126'nın SAK hastalarında kontrollere göre ekspresyonunun azaldığı, buna karşılık miR-146a-5p ve miR-27b-3p ekspresyonunun SAK

grubunda arttığı gözlenmiş olsa da bu 3 miRNA'nın gruplar arasındaki ekspresyon farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 4.6. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubunun periferik kanda miRNA ekspresyon karşılaştırılması

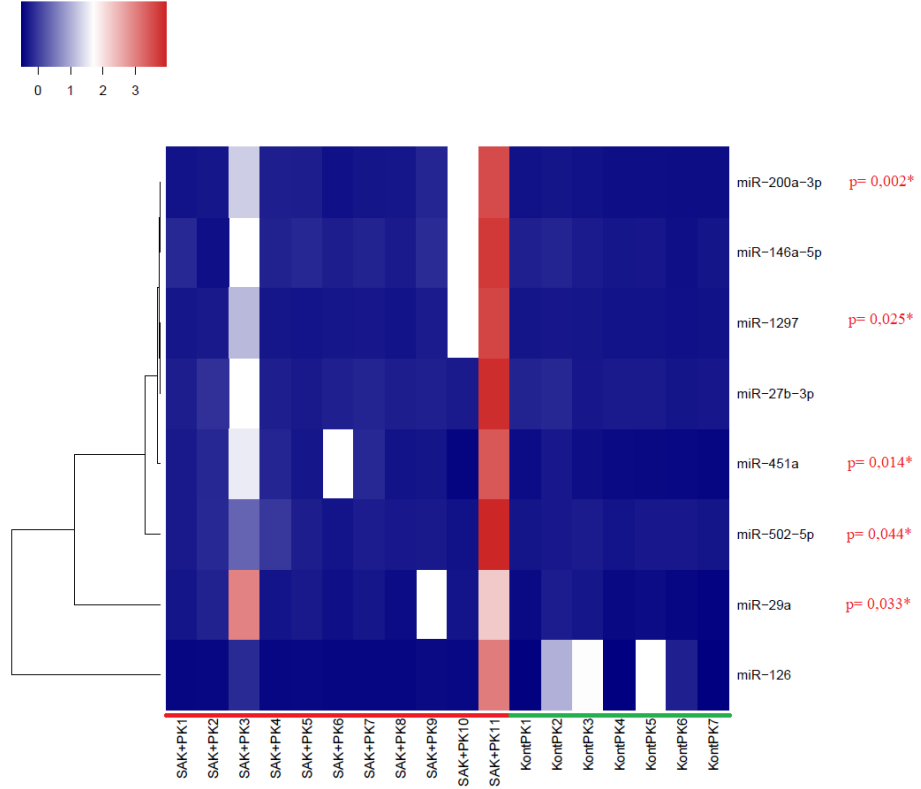
miRNA	Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	p Değeri
miR-126	SAK+ periferik kan	11	11,7864	29,77719	8,97816	0,733
	Kontrol periferik kan	7	19,4067	27,62728	11,27879	
miR-29a	SAK+ periferik kan	10	7,1910	11,52453	3,64438	0,033*
	Kontrol periferik kan	7	1,1557	0,68417	0,25859	
miR-200a-3p	SAK+ periferik kan	10	24,6070	47,72644	15,09243	0,002*
	Kontrol periferik kan	7	1,2514	0,93878	0,35483	
miR-451a	SAK+ periferik kan	10	8,9340	14,49685	4,58430	0,014*
	Kontrol periferik kan	7	1,1100	0,59358	0,22435	
miR-146a-5p	SAK+ periferik kan	9	10,6378	23,11423	7,88259	0,071
	Kontrol periferik kan	7	1,5700	1,02801	0,38855	
miR-1297	SAK+ periferik kan	10	11,2450	23,11423	7,30936	0,025*
	Kontrol periferik kan	7	1,0729	0,41983	0,15868	
miR-27b-3p	SAK+ periferik kan	10	5,7810	13,54624	4,28370	0,088
	Kontrol periferik kan	7	1,1243	0,61487	0,23240	
miR-502-5p	SAK+ periferik kan	11	10,6036	24,36063	7,34501	0,044*
	Kontrol periferik kan	7	1,0729	0,42355	0,16009	

*Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ 'tir.



Şekil 20. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol gurubu bireylerinin periferik kan örneklerinde ekspresyon seviyeleri. A) miR-126 B) miR-29a C) miR-200a-3p D) miR-451a E) miR-146a-5p F) miR-1297 G) miR-27b-3p H) miR-502-5p. SAK hastalarında miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-1297, miR-27b-3p ve miR-502-5p ekspresyon düzeylerinin kontrollere göre artış gösterdiği, buna karşılık miR-126'nın SAK örneklerinde downregüle ekspresyonu tespit edilmiştir.

Gruplar arasında miRNA ekspresyonlarını gösteren heatmap Şekil 4.5.'te gösterilmektedir.



Şekil 4.5. SAK geçiren hastalar ve kontrol gurubu bireylerinin periferik kan örneklerindeki miRNA ekspresyonunun heatmap'i ve hiyerarşik kümelemesi. Alt çizgideki kırmızı renk SAK geçiren hastaları, yeşil renk ise kontrol bireylerini göstermektedir. Sütunlar hasta ve kontrolleri, satırlar ise miRNA'ları temsil etmektedir. Heatmap'te koyu mavi renk downregüle ekspresyonu, buna karşılık koyu kırmızı renk upregüle ekspresyonu göstermektedir.

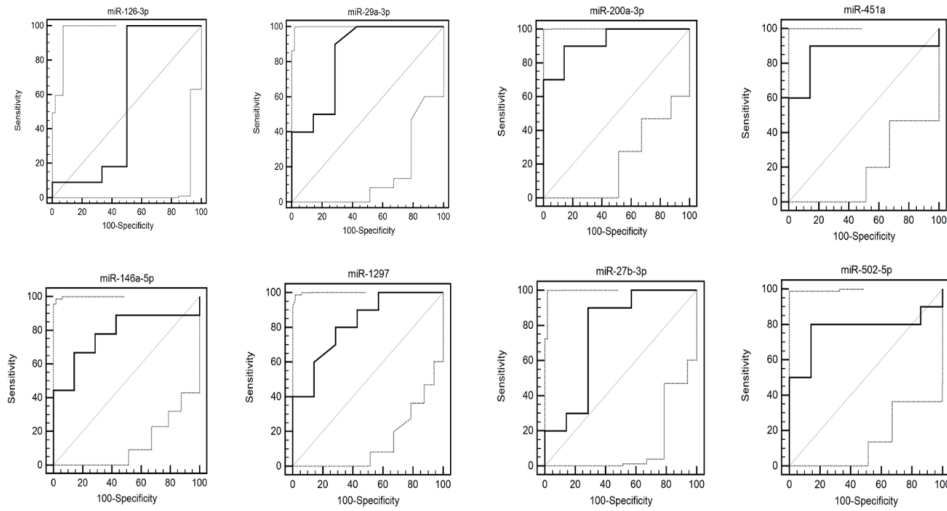
İki grup arasında incelenen sekiz aday sirküle miRNA açısından ROC ve AUC analizleri yapılmıştır. Bu analizlere göre ilgili aday miRNA'ların bir biyomarker olarak kullanılabilmesi için testin spesivite (özellik) ve sensivite (duyarlılık) değerleri hesaplanmıştır. Hasta ve kontrol gruplarına ilişkin miRNA ekspresyon düzeyleri bir frekans dağılım tablosuna kaydedilmiş, miRNA'ların ekspresyonlarına göre eşik (cutt-off) noktaları seçilerek her birinin spesivite ve sensivite hesaplanmıştır. SPSS programı ile yatay eksen spesivite (yanlış pozitiflik oranı) ve dikey eksen sensiviteyi (gerçek pozitiflik oranı) gösterecek şekilde bir ROC eğrisi çizilmiştir. Her bir aday sirküle miRNA'nın doğruluğunu belirlemek için %95 güven sınırlarıyla (%95 CI) eğri altında kalan alan (AUC) ve standart hata hesaplanmıştır. AUC, 0-1 arasında değişmektedir. AUC ne kadar

1'e yaklaşırsa doğruluk artmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Elde edilen ROC ve AUC değerleri Tablo 4.7., Şekil 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.7. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubu bireylerinin periferik kanda incelenen sirküle miRNA'ların ROC ve AUC değerleri

miRNA	Sensivite	Spesivite	AUC (%95 CI)	Cut-off Değeri	P Değeri
miR-126-3p	100,00	50,00	0,561 (0,305-0,795)	$\leq 4,15$	0,764
miR-29a-3p	90,00	71,43	0,836 (0,580-0,967)	$\leq 3,61$	0,002*
miR-200a-3p	90,00	85,71	0,929 (0,696-0,997)	$\leq 3,66$	0,000*
miR-451a	90,00	85,71	0,857 (0,605-0,976)	$\leq 2,94$	0,000*
miR-146a-5p	66,67	85,71	0,778 (0,506-0,942)	$\leq 4,06$	0,028*
miR-1297	80,00	71,43	0,821 (0,563-0,961)	$\leq 5,37$	0,002*
miR-27b-3p	90,00	71,43	0,757 (0,493-0,928)	$\leq 5,35$	0,071
miR-502-5p	80,00	85,71	0,771 (0,508-0,936)	$\leq 2,34$	0,034*

*CI=Confidence interval, AUC=Area Under the Curve, p Değeri= $p < 0,05$.



Şekil 4.6. SAK geçiren hastaların ve kontrol grubu bireylerin periferik kan örneklerinde miRNA ROC eğrileri

Gruplar arasında ROC analizi sonucunda, miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-1297 ve miR-502-5p spesivite, sensivite ve AUC değerleri bakımından yüksek oldukları ve sırasıyla AUC: 0,836 (p=0,002), 0,929 (p=0,000), 0,857 (p=0,000), 0,821 (p=0,002) ve 0,771 (p=0,034) olarak gözlenmiştir. Bu sirküle miRNA'ların bir biyomarker olarak hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği gösterdikleri bulunmuştur.

4.5.3. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubunun BOS'ta miRNA ekspresyon karşılaştırılması

Tablo 4.8.'de, SAK geçiren hastalar ve kontrol grubunun BOS'ta miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında miR-29a ve miR-502-5p'nin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Normal dağılım gösteren olgu ve kontrollerin istatistiksel analizi t-testi ile gerçekleştirilmiştir. Diğer miRNA'lar olgu ve kontrol grubu örneklerinde normal olarak dağılmadığından istatistiksel analizleri Mann-Whitney U Test ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

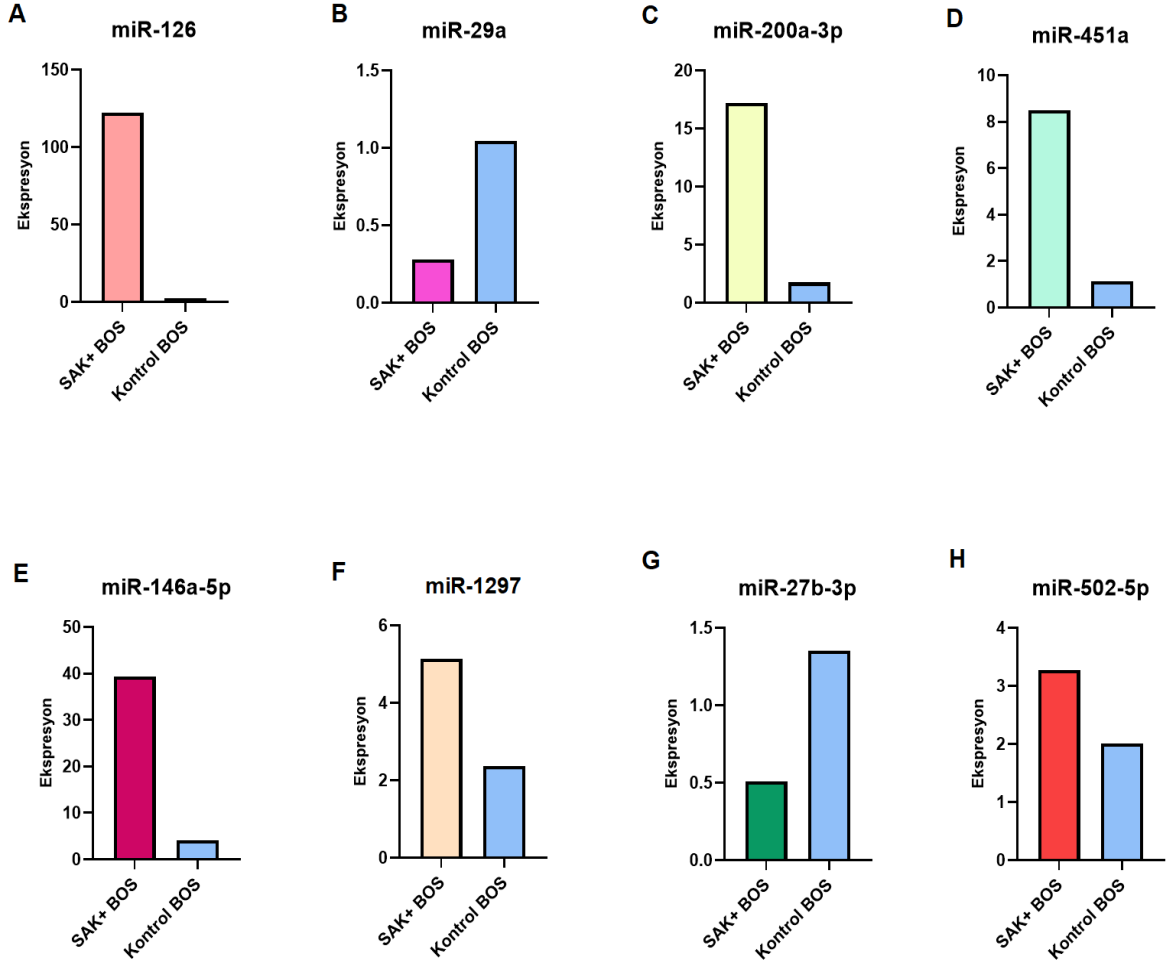
Gruplar arasında ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, miR-126, miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p ve miR-27b-3p düzeyleri iki grup arasında istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur (Bu farklılıklar sırasıyla, $p=0,019$, $p=0,002$, $p=0,019$, $p=0,024$, $p=0,013$ ve $p=0,020$ şeklinde idi).

Gruplar arasında kat değişim hesaplamaları yapılmış olup sonuçlar Şekil 4.7.'de yer almaktadır. SAK geçiren hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanan altı sirküle miRNA'daki ekspresyon düzeyleri kat değişimleri değerlendirildiğinde, SAK hastalarında kontrollere göre miR-126, miR-200a-3p, miR-451a ve miR-146a-5p'nin ekspresyonunun arttığı, buna karşılık miR-29a ve miR-27b-3p'nin SAK örneklerinde daha düşük oranda ifade buldukları (downregüle ekspresyon) tespit edilmiştir. SAK'ta kontrollere göre miR-126'da 47.23 kat, miR-200a-3p'de 9.75 kat , miR-451a'da 7.45 kat ve miR-146a-5p'de 9.45 kat artış gözlenmiştir. Diğer 2 miRNA olan miR-29a ve miR-27b-3p ekspresyon düzeylerinin SAK örneklerinde kontrollere göre sırasıyla 3.74 kat ve 2.65 kat daha az olduğu. miR-1297 ve miR-502-5p'nin SAK örneklerinde kontrollere göre daha fazla ifade buldukları (upregüle ekspresyonları) saptanmış olsa da istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamaktaydı.

Tablo 4.8. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubunun BOS'ta miRNA ekspresyon karşılaştırılması

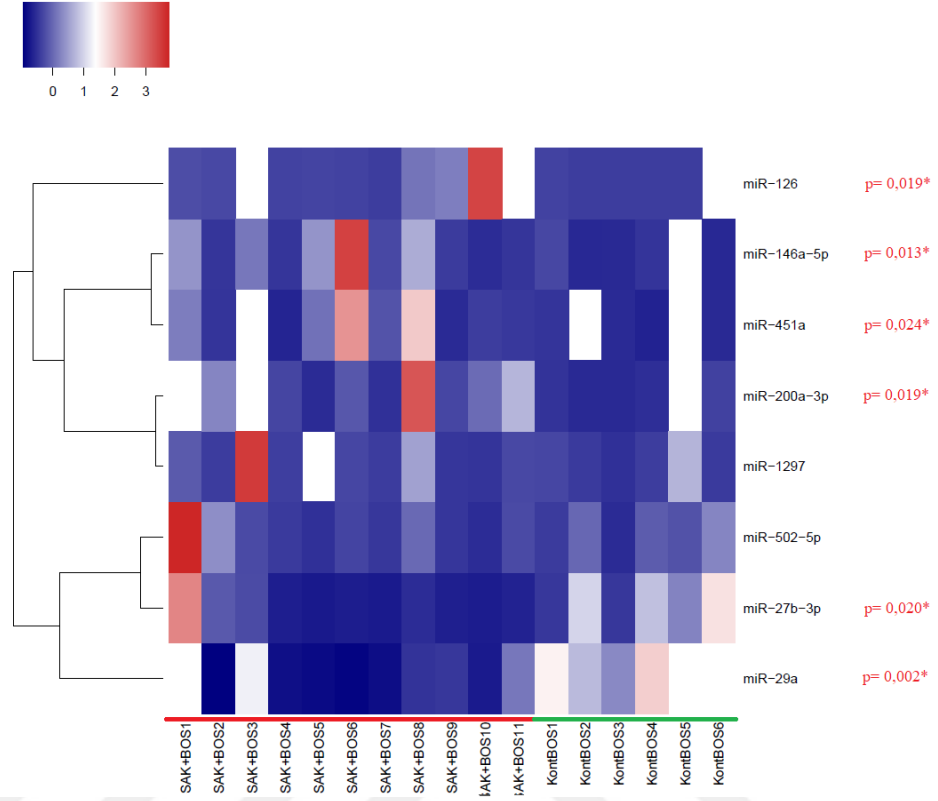
miRNA	Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	p Değeri
miR-126	Hasta	9	122,4233	253,46024	84,48675	0,019*
	Kontrol	5	2,5920	4,10165	1,83431	
miR-29a	Hasta	10	0,2800	0,33183	0,10493	0.002*
	Kontrol	4	1,0475	0,35255	0,17628	
miR-200a-3p	Hasta	9	17,1911	23,66368	7,88789	0,019*
	Kontrol	5	1,7620	1,88293	0,84207	
miR-451a	Hasta	10	8,5040	10,63573	3,36331	0,024*
	Kontrol	4	1,1400	0,63272	0,31636	
miR-146a-5p	Hasta	11	39,3518	56,49055	17,03254	0,013*
	Kontrol	5	4,1600	6,05335	2,70714	
miR-1297	Hasta	10	5,1480	9,90366	3,13181	0,492
	Kontrol	6	2,3700	3,69080	1,50676	
miR-27b-3p	Hasta	11	0,5091	1,12286	0,33855	0,020*
	Kontrol	6	1,3517	0,95231	0,38878	
miR-502-5p	Hasta	11	3,2800	6,34443	1,91292	0,641
	Kontrol	6	2,0100	1,50085	0,61272	

*Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ 'tir.



Şekil 4.7. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubunun BOS'ta seviyeleri. A) miR-126 B) miR-29a C) miR-200a-3p D) miR-451a E) miR-146a-5p F) miR-1297 G) miR-27b-3p H) miR-502-5p. SAK hastalarında kontrollere göre miR-126, miR-200a-3p, miR-451a ve miR-146a-5p'nin upregüle ekspresyonu, buna karşılık miR-29a ve miR-27b-3p'nin SAK örneklerinde downregüle ekspresyonu tespit edilmiştir.

Gruplar arasında miRNA ekspresyonlarını gösteren heatmap Şekil 4.8.'de gösterilmektedir.



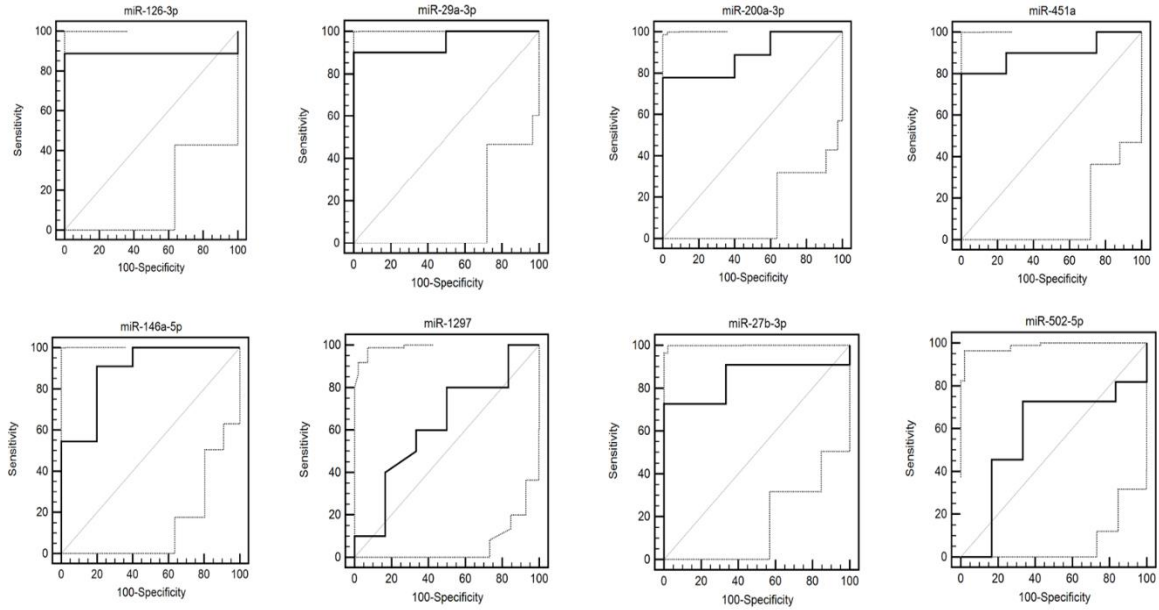
Şekil 4.8. SAK geçiren hastalar ve kontrol gurubu bireylerinin BOS örneklerindeki miRNA ekspresyonunun heatmap'i ve hiyerarşik kümelemesi. Alt çizgideki kırmızı renk SAK geçiren hastaları, yeşil renk ise kontrol bireylerini göstermektedir. Sütunlar hasta ve kontrolleri, satırlar ise miRNA'ları temsil etmektedir. Heatmap'te koyu mavi renk downregüle ekspresyonu, buna karşılık koyu kırmızı renk upregüle ekspresyonu göstermektedir.

İki grup arasında incelenen sekiz aday sirküle miRNA açısından ROC ve AUC analizleri yapılmış olup elde edilen ROC ve AUC değerleri Tablo 4.9. ve Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.9. Subaraknoid kanama geçiren hastalar ve kontrol grubunun BOS'ta incelenen sirküle miRNA'ların ROC ve AUC değerleri

miRNA	Sensivite	Spesivite	AUC (%95 CI)	Cut-off Değeri	P Değeri
miR-126-3p	88,89	100,00	0,889 (0,610-0,991)	$\leq 8,11$	0,000*
miR-29a-3p	90,00	100,00	0,950 (0,691-1,000)	$> 5,99$	0,000*
miR-200a-3p	77,78	100,00	0,889 (0,610-0,991)	$\leq 9,71$	0,000*
miR-451a	80,00	100,00	0,900 (0,624-0,994)	$\leq 10,11$	0,000*
miR-146a-5p	90,91	80,00	0,891 (0,636-0,989)	$\leq 9,78$	0,000*
miR-1297	80,00	50,00	0,625 (0,354-0,848)	$\leq 10,85$	0,430
miR-27b-3p	72,73	100,00	0,848 (0,595-0,973)	$> 8,76$	0,000*
miR-502-5p	72,73	66,67	0,576 (0,318-0,806)	$> 8,16$	0,642

*CI=Confidence interval, AUC=Area Under the Curve, p Değeri= $p < 0,05$.



Şekil 4.9. SAK geçiren hastaların ve kontrollerin BOS grubundaki miRNA ROC eğrileri

Gruplar arasında ROC analizi sonucunda, miR-126, miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a, miR-27b-5p spesivite, sensivite ve AUC değerleri bakımından yüksek oldukları ve sırasıyla AUC: 0,889 (p=0,000), 0,950 (p=0,000), 0,889 (p=0,000), 0,900 (p=0,000), 0,891 (p=0,000) ve 0,848 (p=0,000) olarak gözlenmiştir. Bu sirküle miRNA'ları bir biyomarker olarak hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği gösterdikleri bulunmuştur.

4.5.4. SAK geçiren ve SAK geçirmeyen hastaların periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon profillerinin karşılaştırılması

Tablo 4.10.'da, SAK geçiren ve geçirmeyen hastaların periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Vakaların normal olarak dağılmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle istatistiksel analizi Mann-Whitney U Test ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

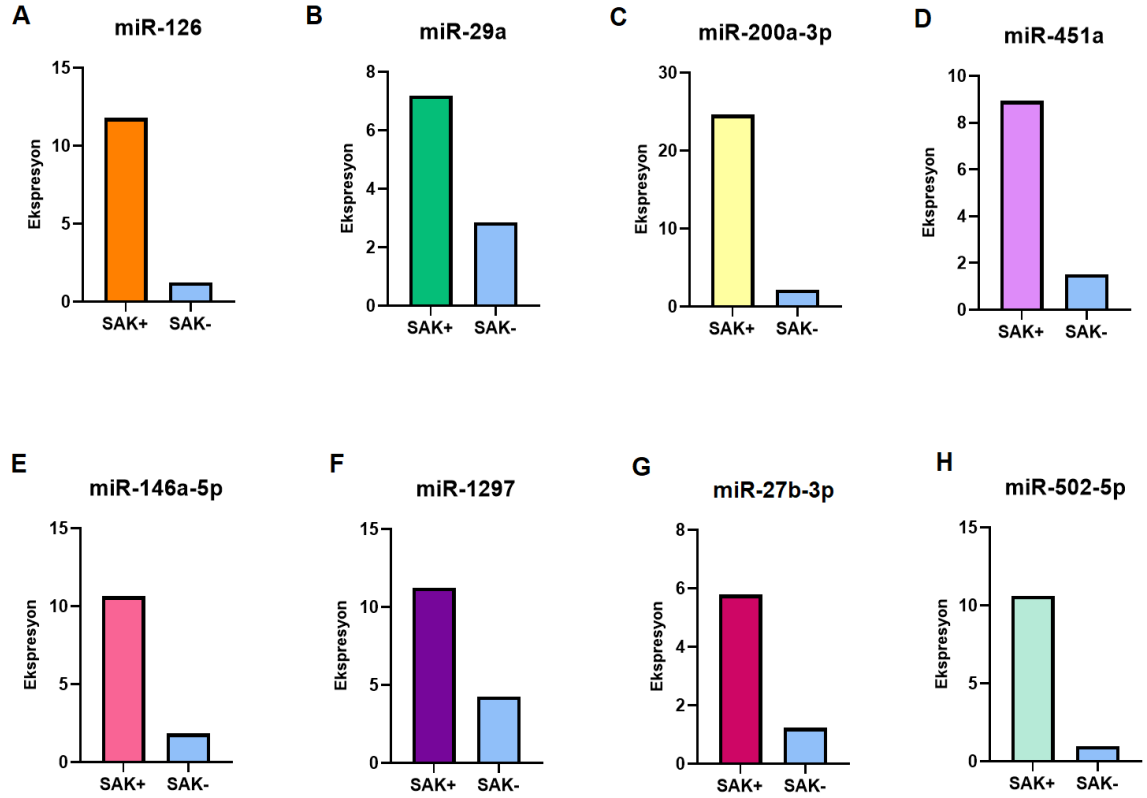
Gruplar arasında ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında miR-126, miR-200a-3p, miR-451a ve miR-502-5p düzeyleri iki grup arasında istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur (Bu farklılıklar sırasıyla, $p=0,001$, $p=0,005$ ve $p=0,043$, $p=0,044$ şeklinde idi).

Gruplar arasında kat değişim hesaplamaları yapılarak sonuçlar Şekil 4.10.'da özetlenmiştir. SAK geçiren ve geçirmeyen hasta grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olan dört sirküle miRNA açısından, SAK geçiren vaka örneklerinde geçirmeyenlere göre miR-126, miR-200a-3p, miR-451a ve miR-502-5p ekspresyon düzeylerinin arttığı saptanmıştır ki bu artışların sırasıyla 9.43, 11.47, 5.84 ve 10.66 kat olduğu saptanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılığın bulunmadığı diğer miRNA'ların ekspresyonlarının da yine SAK geçiren vaka örneklerinde artış gösterdiği görülmüştür. Dolayısıyla, incelenen miRNA'ların ekspresyonlarının genel olarak SAK geçiren olgu örneklerinde arttığı ve bunlardan 4 tanesinin anlamlı düzeyde olduğu söylenebilir.

Tablo 4.10. SAK geçiren ve SAK geçirmeyen hastaların periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon karşılaştırılması

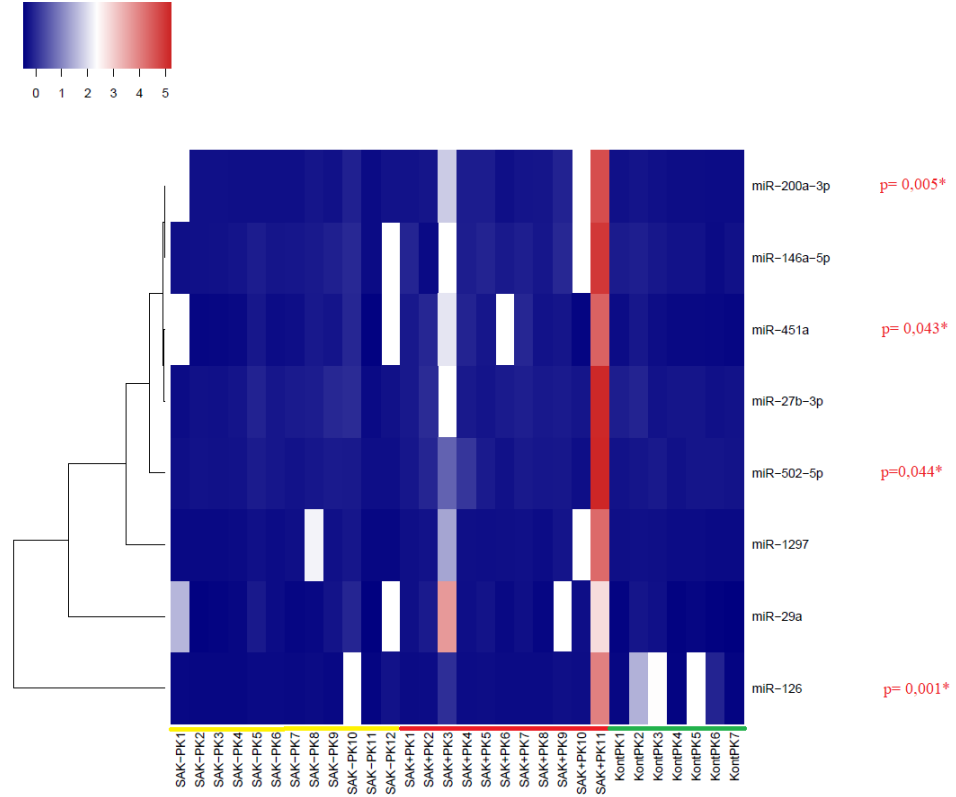
miRNA	Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama Standart Hata	p Değeri
miR-126	SAK -	11	1,2491	0,91418	0,27564	0,001*
	SAK +	11	11,7864	29,77719	8,97816	
miR-29a	SAK -	11	2,8618	4,43985	1,33867	0,152
	SAK +	10	7,1910	11,52453	3,64438	
miR-200a-3p	SAK -	11	2,1436	1,75116	0,52799	0,005*
	SAK +	10	24,6070	47,72644	15,09243	
miR-451a	SAK -	10	1,5280	1,11983	0,35412	0,043*
	SAK +	10	8,9340	14,49685	4,58430	
miR-146a-5p	SAK -	11	1,8409	1,28244	0,38667	0,067
	SAK +	9	10,6378	23,64776	7,88259	
miR-1297	SAK -	12	4,2525	11,52387	3,32665	0,059
	SAK +	10	11,2450	23,11423	7,30936	
miR-27b-3p	SAK -	12	1,2317	0,93808	0,27080	0,180
	SAK +	10	5,7810	13,54624	4,28370	
miR-502-5p	SAK -	12	0,9942	0,77331	0,22324	0,044*
	SAK +	11	10,6036	24,36063	7,34501	

*Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ 'tir. SAK+: Subaraknoid kanama geçiren, SAK-: Subaraknoid kanama geçirmeyen



Şekil 4.10. Subaraknoid kanama geçiren (SAK+) ve geçirmeyen (SAK-) gruplar arasındaki ekspresyon seviyeleri. A) miR-126 B) miR-29a C) miR-200a-3p D) miR-451a E) miR-146a-5p F) miR-1297 G) miR-27b-3p H) miR-502-5p. SAK geçiren vaka örneklerinde geçirmeyenlere göre miR-126, miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-1297, miR-27b-3p ve miR-502-5p ekspresyon düzeylerinin arttığı saptanmıştır.

SAK geçiren, SAK geçirmeyen ve kontrol gruplar arasındaki miRNA ekspresyonlarını gösteren heatmap Şekil 4.11.'de gösterilmektedir.



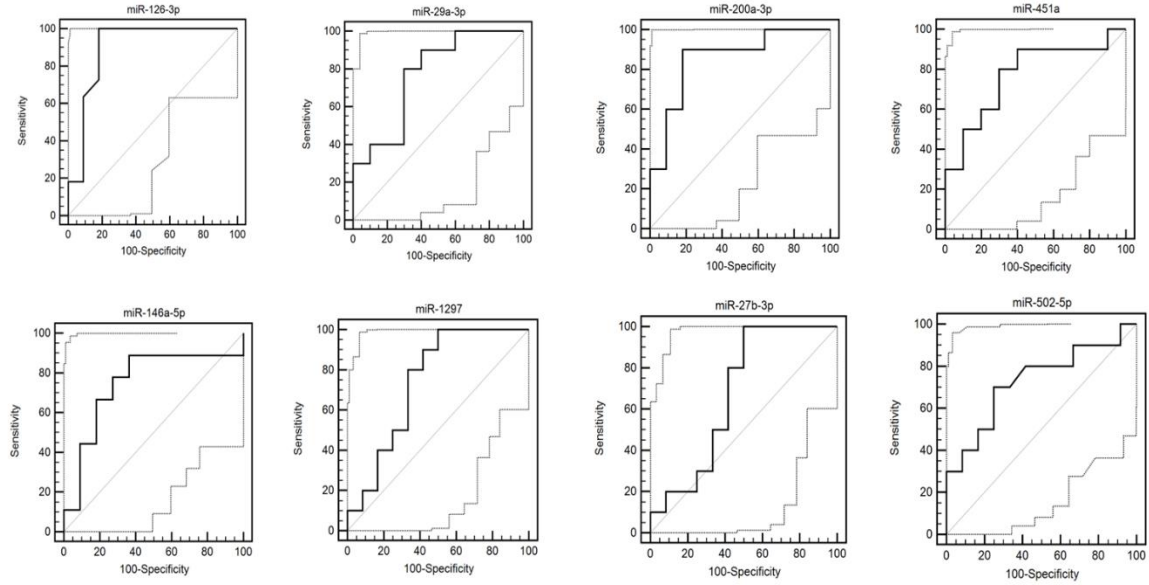
Şekil 4.11. SAK geçiren, SAK geçirmeyen ve kontrol grubu bireylerinin periferik kan örneklerindeki miRNA ekspresyonunun heatmap'i ve hiyerarşik kümelemesi. Alt çizgideki sarı renk SAK geçirmeyen hastaları, kırmızı renk SAK geçiren hastaları ve yeşil renk ise kontrol bireylerini göstermektedir. Sütunlar hasta ve kontrolleri, satırlar ise miRNA'ları temsil etmektedir. Heatmap'te koyu mavi renk downregüle ekspresyonu, buna karşılık koyu kırmızı renk upregüle ekspresyonu göstermektedir.

İki grup arasında incelenen sekiz aday sirküle miRNA'nın ROC ve AUC analizleri yapılmış ve ROC ile AUC değerleri Tablo 4.11. ve Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.11. SAK geçiren ve SAK geçirmeyen hastaların periferik kan örneklerinde incelenen sirküle miRNA’ların ROC ve AUC değerleri

miRNA	Sensivite	Spesivite	AUC (%95 CI)	Cut-off Değeri	P Değeri
miR-126-3p	100,00	81,82	0,897 (0,692-0,985)	$\leq 4,15$	0,000*
miR-29a-3p	80,00	70,00	0,770 (0,530-0,926)	$\leq 3,24$	0,014*
miR-200a-3p	90,00	81,82	0,855 (0,633-0,968)	$\leq 3,66$	0,000*
miR-451a	80,00	70,00	0,770 (0,530-0,926)	$\leq 2,74$	0,016*
miR-146a-5p	88,89	63,64	0,747 (0,506-0,912)	$\leq 4,69$	0,049*
miR-1297	100,00	50,00	0,742 (0,513-0,902)	$\leq 5,94$	0,029*
miR-27b-3p	100,00	50,00	0,675 (0,444-0,856)	$\leq 5,52$	0,152
miR-502-5p	70,00	75,00	0,729 (0,500-0,894)	$\leq 2,2$	0,047*

*CI=Confidence interval, AUC=Area Under the Curve, p Değeri= $p < 0,05$.



Şekil 4.12. SAK geçiren ve SAK geçirmeyen hastaların periferik kan örneklerinde miRNA ROC eğrileri

Gruplar arasında ROC analizi sonucunda, miR-126, miR-200a-3p, miR-451a ve miR-502-5p spesivite, sensivite ve AUC değerlerinin yüksek oldukları ve AUC değerleri sırasıyla 0,897 ($p=0,000$), 0,855 ($p=0,000$), 0,77 ($p=0,016$) ve 0,729 ($p=0,047$) olarak gözlenmiştir. Bu sirküle miRNA'ların bir biyomarker olarak SAK geçiren ve geçirmeyen gruplar arasında güçlü bir ayırt etme özelliği gösterdikleri bulunmuştur.

4.5.5. Subaraknoid kanama geçiren vakaların kan ve BOS örneklerinde miRNA ekspresyon karşılaştırılması

Tablo 4.12.'de, SAK geçiren vakaların kan ve BOS örneklerinde miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Olgu ve kontrol grubu örneklerinin normal dağılım göstermemeleri nedeniyle istatistiksel değerlendirmelerde Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

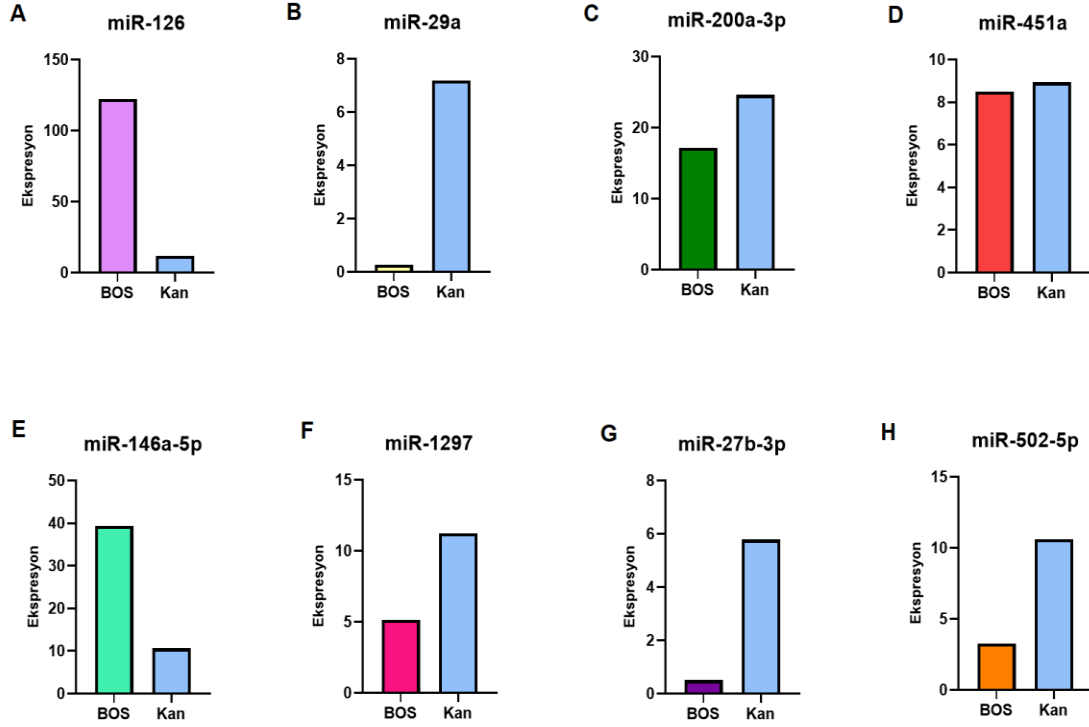
Gruplar arasında ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında; miR-126, miR-29a, miR-146a-5p ve miR-27b-3p ekspresyon düzeyleri iki grup arasında istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur (Bu farklılıklar sırasıyla, $p=0,012$, $p=0,00$, $p=0,010$ ve $p=0,001$ şeklinde idi).

Şekil 4.13.'te verilen gruplar arası kat değişim oranları değerlendirildiğinde; SAK geçiren olguların BOS örneklerinde miR-126 (10,38 kat) ve miR-146a-5p (3,69 kat) ekspresyon düzeylerinin arttığı, buna karşılık miR-29a (25,68 kat) ve miR-27b-3p (11,35 kat) düzeylerinin azaldığı dikkati çekmektedir. MiRNA ekspresyon alterasyonları olmakla birlikte istatistiksel anlamlılık göstermeyen miR-200a-3p, miR-451a, miR-1297 ve miR-502-5p'nin BOS örneklerinde kana göre daha düşük oranda ifade edildikleri gözlenmiştir.

Tablo 4.12. SAK geçiren vakaların kan ve BOS örneklerinde miRNA ekspresyon karşılaştırılması

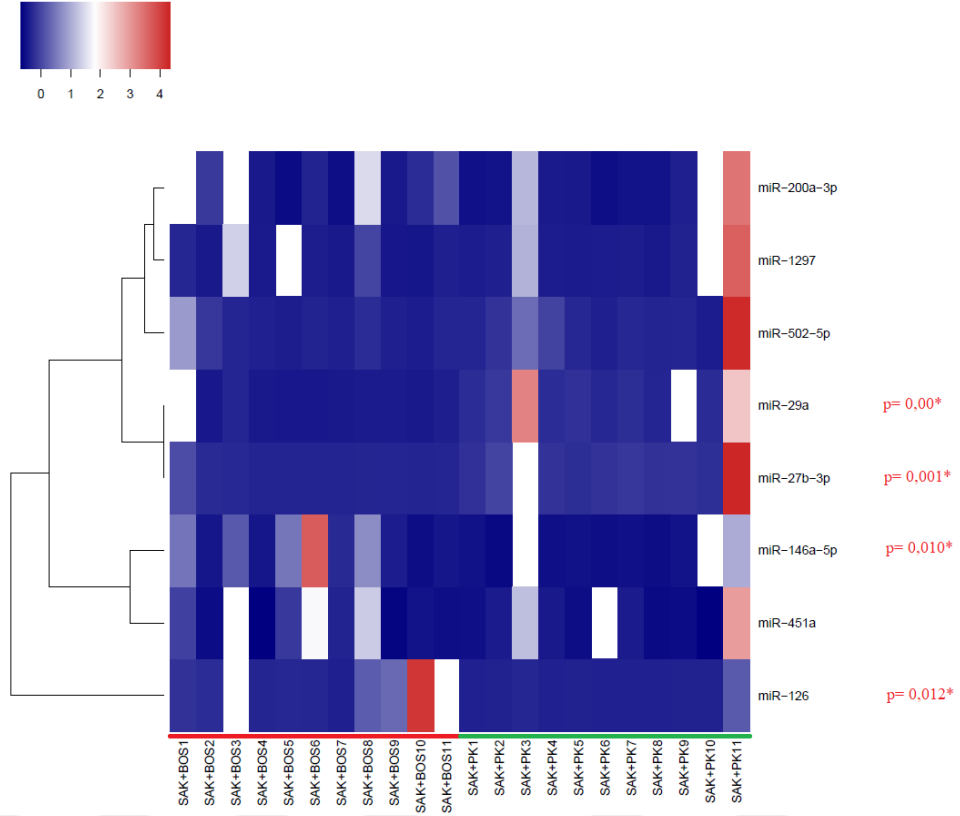
miRNA	Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	p Değeri
miR-126	BOS	9	122,4233	253,46024	84,48675	0,012*
	Kan	11	11,7864	29,77719	8,97816	
miR-29a	BOS	10	0,2800	0,33183	0,10493	0,00*
	Kan	10	7,1910	11,52453	3,64438	
miR-200a-3p	BOS	9	17,1911	23,66368	7,88789	0,604
	Kan	10	24,6070	47,72644	15,09243	
miR-451a	BOS	10	8,5040	10,63573	3,36331	0,739
	Kan	10	8,9340	14,49685	4,58430	
miR-146a-5p	BOS	11	39,3518	56,49055	17,03254	0,010*
	Kan	9	10,6378	23,64776	7,88259	
miR-1297	BOS	10	5,1480	9,90366	3,13181	0,436
	Kan	10	11,2450	23,11423	7,30936	
miR-27b-3p	BOS	11	0,5091	1,12286	0,33855	0,001*
	Kan	10	5,7810	13,54624	4,28370	
miR-502-5p	BOS	11	3,2800	6,34443	1,91292	0,243
	Kan	11	10,6036	24,36063	7,34501	

*Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ 'tir.



Şekil 4.13. Subaraknoid kanama geçiren hastaların kan ve BOS grubu arasındaki ekspresyon seviyeleri. A) miR-126 B) miR-29a C) miR-200a-3p D) miR-451a E) miR-146a-5p F) miR-1297 G) miR-27b-3p H) miR-502-5p. SAK geçiren olguların BOS örneklerinde kana göre miR-126, miR-146a-5p'nin upregüle ekspresyonu, buna karşılık miR-29a, miR-27b-3p, miR-200a-3p, miR-451a, miR-1297 ve miR-502-5p'nin downregüle ekspresyonu tespit edilmiştir.

Gruplar arasında miRNA ekspresyonlarını gösteren heatmap Şekil 4.14.'te gösterilmektedir.



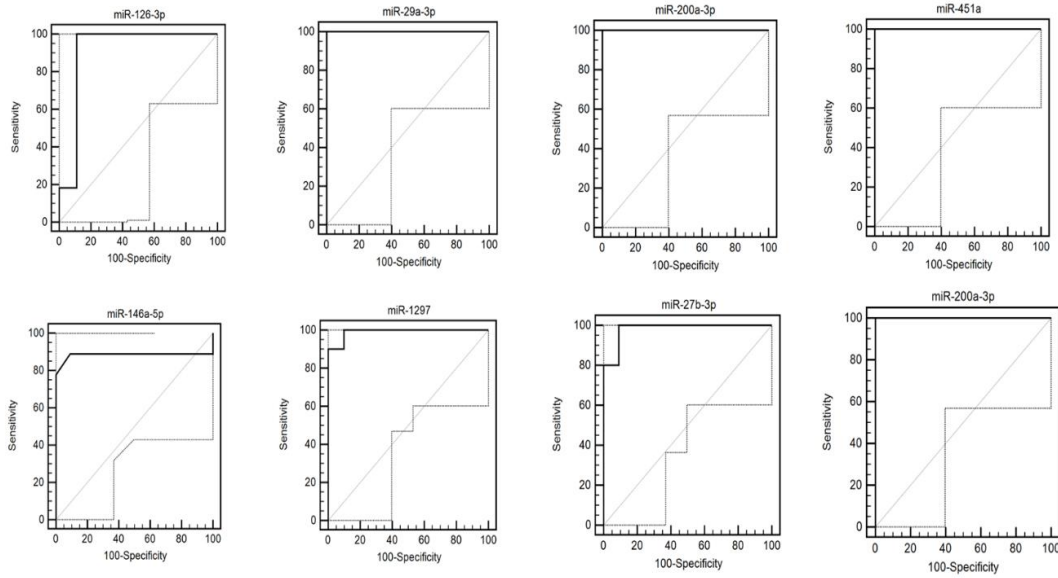
Şekil 4.14. SAK geçiren hastaların kan ve BOS grubunda miRNA ekspresyonunun heatmap'i ve hiyerarşik kümelemesi. Alt çizgideki kırmızı renk SAK geçiren hastaların BOS'u, yeşil renk ise SAK geçiren hastaların kan grubunu göstermektedir. Sütunlar hastaları, satırlar ise miRNA'ları temsil etmektedir. Heatmap'te koyu mavi renk downregüle ekspresyonu, buna karşılık koyu kırmızı renk upregüle ekspresyonu göstermektedir.

İki grup arasında incelenen sekiz aday sirküle miRNA açısından ROC ve AUC analiz değerleri Tablo 4.13. ve Şekil 4.15.'te gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.13. SAK geçiren vakaların kan ve BOS örneklerinde incelenen sirküle miRNA'ların ROC ve AUC değerleri

miRNA	Sensivite	Spesivite	AUC (%95 CI)	Cut-off Değeri	P Değeri
miR-126-3p	100,00	88,89	0,909 (0,695-0,990)	$\leq 4,15$	0,000*
miR-29a-3p	100,00	100,00	1 (0,832-1)	$\leq 3,9$	0,000*
miR-200a-3p	100,00	100,00	1 (0,824-1)	$\leq 4,46$	0,000*
miR-451a	100,00	100,00	1 (0,832-1)	$\leq 4,95$	0,000*
miR-146a-5p	88,89	90,91	0,884 (0,662-0,982)	$\leq 4,69$	0,000*
miR-1297	90,00	100,00	0,990 (0,814-1)	$\leq 5,55$	0,000*
miR-27b-3p	100,00	90,91	0,982 (0,807-1)	$\leq 5,52$	0,000*
miR-502-5p	100,00	90,91	0,991 (0,823-1)	$\leq 6,79$	0,000*

*CI=Confidence interval, AUC=Area Under the Curve, p Değeri=p<0,05.



Şekil 4.15. SAK geçiren vakaların kan ve BOS örneklerinde miRNA ROC eğrileri

Gruplar arasında ROC analizi sonucunda, miR-126, miR-29a, miR-146a-5p ve miR-27b-3p spesivite, sensivite ve AUC değerleri bakımından yüksek oldukları ve sırasıyla AUC: 0,909 (p=0,000), 1 (p=0,000), 0,884 (p=0,000) ve 0,982 (p=0,000) olarak

bulunmuştur. BOS ve kan arasındaki ekspresyon farklılıkları nöroinflamasyon ve kan beyin bariyer hasarına yol açan değişmiş sistematik enflamatuvar yanıtı yansıtabilmektedir. Bu miRNA'lar aSAK'ta altta yatan nöroinflamasyon hakkında bize fikir verebilmektedir.

4.5.6. Subaraknoid kanama geçirmeyen hastalar ve kontrol grubunun periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon karşılaştırılması

Tablo 4.14.'te, SAK geçirmeyen olgular ile kontrol grubu bireylerinin periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Hasta ve kontrol arasında normal dağılım göstermeyen (miR-126 ve miR-1297) Mann-Whitney U Test, normal dağılım gösteren miRNA'lara (miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-27b-3p ve miR-502-5p) istatistiksel analiz t-test gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda olgu ve kontrol gruplarında, miRNA ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

Tablo 4.14. Subaraknoid kanama geçirmeyen hastalar ve kontrol grubunun periferik kanda miRNA ekspresyon karşılaştırılması

miRNA	Gruplar	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	p Değeri
miR-126	SAK-	11	1,2491	0,91418	0,27564	0,808
	Kontrol	6	19,4067	27,62728	11,27879	
miR-29a	SAK-	11	2,8618	4,43985	1,33867	0,333
	Kontrol	7	1,557	0,68417	0,25859	
miR-200a-3p	SAK-	11	2,1436	1,75116	0,52799	0,236
	Kontrol	7	1,2514	0,93878	0,35483	
miR-451a	SAK-	10	1,5280	1,11983	0,35412	0,384
	Kontrol	7	1,1100	0,59358	0,22435	
miR-146a-5p	SAK-	11	1,8409	1,28244	0,38667	0,645
	Kontrol	7	1,5700	1,02801	0,38855	
miR-1297	SAK-	12	4,2525	11,52387	3,32665	0,650
	Kontrol	7	1,0729	0,41983	0,15868	
miR-27b-3p	SAK-	12	1,2317	0,93808	0,27080	0,791
	Kontrol	7	1,1243	0,61487	0,23240	
miR-502-5p	SAK-	12	0,9942	0,77331	0,22324	0,778
	Kontrol	7	1,0729	0,42355	0,16009	

4.5.7. Subaraknoid kanama geçiren vakaların kan örneklerinde miRNA ekspresyon profillerinin olgu klinik özellikleri (Fisher skoru, Hunt-Hess skoru ve modifiye rankın skalası) ile karşılaştırılması

SAK geçiren vakalarda, klinik değerlendirmede Fisher skoru, Hunt-Hess skoru ve modifiye rankın skalası kullanılmıştır. Önceden bahsedildiği gibi çalışmamızda hastalar hafif ve şiddetli klinik bulgularına göre ikiye ayrılmıştır. Bu iki gruba göre miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Grupların normal dağılım göstermemeleri

nedeniyle Mann-Whitney U Testi aracılığıyla gruplar karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

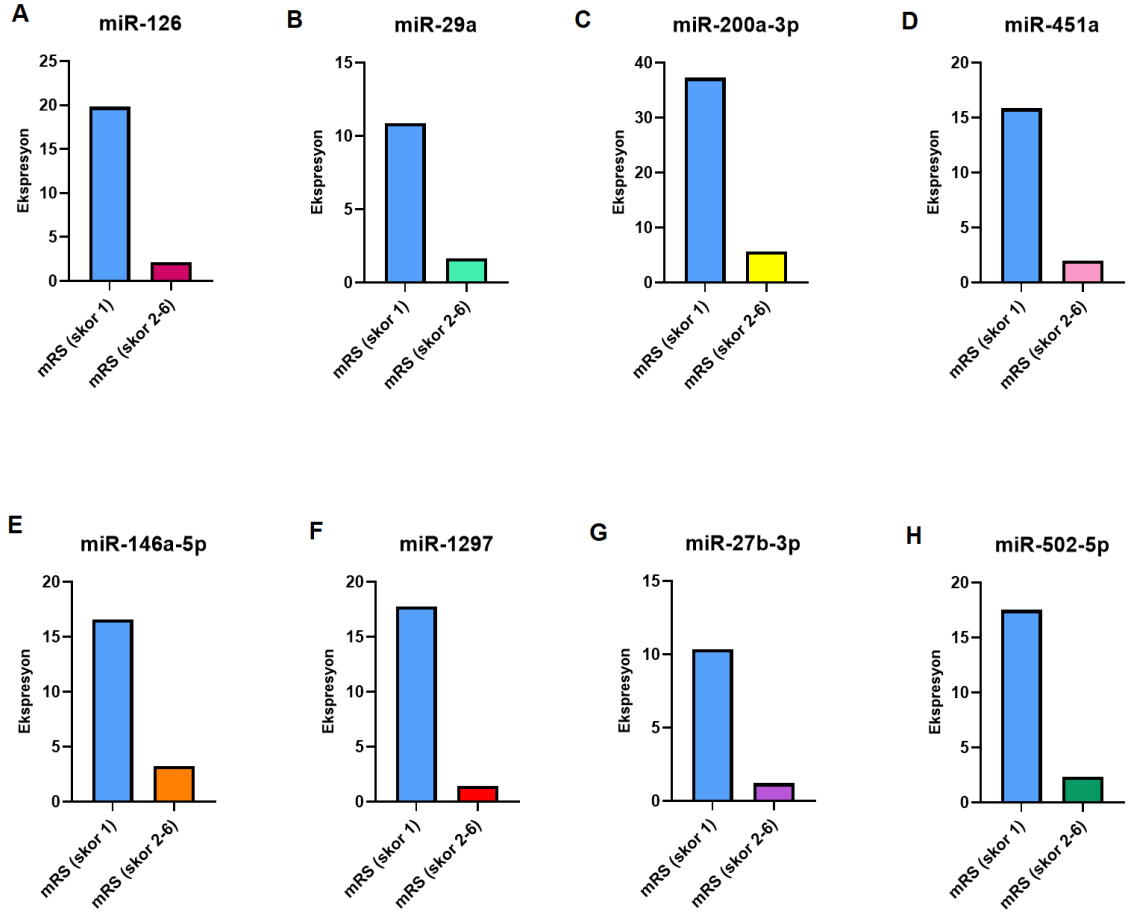
Analiz sonucunda Fisher skoru ve Hunt-Hess skoru gruplarında, miRNA ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Tablo 4.15.'da gösterildiği gibi hastalarda sağkalım ile ilişkili modifiye rankın skalası (mRS) değerlendirilmesinde genel olarak tüm miRNA'ların şiddetli klinik özelliği olan mRS 2-6 grubunda ekspresyonlarının azaldığı dikkati çekmiştir. Ancak bunlar arasında miR-451a düzeyinin, mRS 1 (iyi sonuç) ve mRS 2-6 (kötü sonuç) gruplar arasında istatistiksel olarak önemli derecede anlamlılık gösterdiği saptanmıştır ($p=0,016$).

Gruplar arasında kat değişim hesaplamaları yapılmış olup elde edilen sonuçlar Şekil 4.16.'da gösterilmektedir. SAK geçiren hastaların mRS grupları temelinde periferik kan miRNA ekspresyon düzeyleri kıyaslandığında; şekilde de görüldüğü gibi tüm miRNA'ların kötü klinik özellik grubu olan mRS 2-6 grubu olgu örneklerinde ekspresyonlarının azaldığı, bunlardan miR-451a ekspresyon düzeyi azalmasının (downregülasyonu) istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.15. SAK geçiren vakaların kan örneklerimde miRNA ekspresyon profilinin modifiye rankın skalası ile karşılaştırılması

miRNA	Modifiye Rankın Skalası	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	p Değeri
miR-126	1	6	19,8217	40,03481	16,34414	1,000
	2-6	5	2,1440	0,38965	0,17426	
miR-29a	1	6	10,8833	14,07320	5,74536	0,171
	2-6	4	1,6525	0,43115	0,21558	
miR-200a-3p	1	6	37,2433	60,15795	24,55938	0,610
	2-6	4	5,6525	1,85009	0,92504	
miR-451a	1	5	15,8580	18,75504	8,38751	0,016*
	2-6	5	2,0100	1,11841	0,50017	
miR-146a-5p	1	5	16,5660	31,91615	14,27334	1,000
	2-6	4	3,2275	1,12574	0,56287	
miR-1297	1	6	17,7683	28,87600	11,78858	0,114
	2-6	4	1,4600	0,57242	0,28621	
miR-27b-3p	1	5	10,3520	18,98923	8,49224	0,56
	2-6	5	1,2100	0,22372	0,10005	
miR-502-5p	1	6	17,5050	32,49653	13,26665	0,429
	2-6	5	2,3220	2,52879	1,13091	

*Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ 'tir.



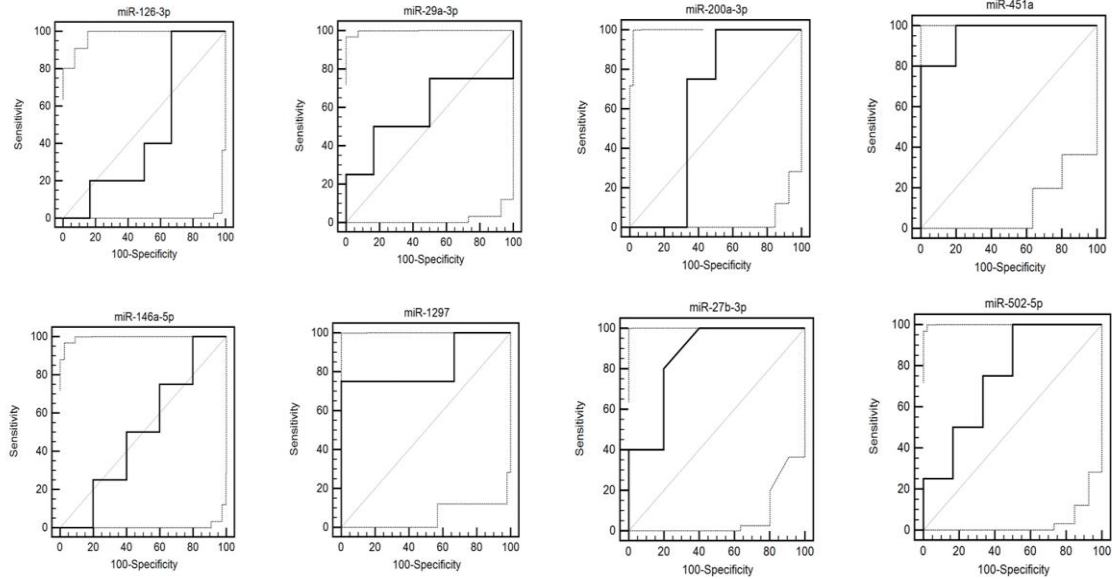
Şekil 4.16. Subaraknoid kanama geçiren hastaların kan grubunda modifiye rankın skalaları arasındaki ekspresyon seviyeleri. A) miR-126 B) miR-29a C) miR-200a-3p D) miR-451a E) miR-146a-5p F) miR-1297 G) miR-27b-3p H) miR-502-5p. SAK geçiren hastalarda mRS 2-6 grubu olgu örneklerinde, tüm miRNA ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir.

Klinik şiddet grupları arasındaki miRNA ekspresyon düzeylerinin ROC ve AUC analizleri verileri Tablo 4.16. ve Şekil 4.17.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.16. SAK geçiren vakaların kan örneklerinde modifiye rankin skalası grupları arasında incelenen sirküle miRNA'ların ROC ve AUC değerleri

miRNA	Sensivite	Spesivite	AUC (%95 CI)	Cut-off Değeri	P Değeri
miR-126-3p	100,00	33,33	0,467 (0,176-0,775)	>1,48	0,868
miR-29a-3p	50,00	83,33	0,583 (0,249-0,868)	>3,18	0,723
miR-200a-3p	100,00	50,00	0,625 (0,283-0,893)	<=3,23	0,543
miR-451a	100,00	80,00	0,960 (0,632-1)	>1,85	0,000*
miR-146a-5p	100,00	20,00	0,500 (0,173-0,827)	>-0,63	1,000
miR-1297	75,00	100,00	0,833 (0,479-0,985)	>5,35	0,056
miR-27b-3p	80,00	80,00	0,860 (0,508-0,991)	>4,88	0,006*
miR-502-5p	100,00	50,00	0,750 (0,394-0,956)	>0,77	0,136

*CI=Confidence interval, AUC=Area Under the Curve, p Değeri=p<0,05.



Şekil 4.17. SAK geçiren vakaların kan örneklerinde modifiye rankin skalası grupları arasında miRNA ROC eğrileri

Gruplar arasında ROC analizi sonucunda, miR-451a ve miR-27b-3p spesivite, sensivite ve AUC değerleri bakımından yüksek oldukları ve sırasıyla AUC: 0,960 ($p=0,000$) ve 0,860 ($p=0,006$) olarak gözlenmiştir. Bu sirküle miRNA'lar bir biyomarker olarak ölen veya sakat kalan hastalar ile iyileşen hasta grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği gösterdikleri bulunmuştur.



5. TARTIŞMA

İntrakranial anevrizma, serebral arterlerin patolojik olarak zayıfladığı serebrovasküler bir hastalıktır. İA kanaması hayatı tehdit eden anevrizmal subaraknoid kanamaya neden olur (W. X. Wang, Springer, & Hatton, 2021). aSAK tüm inmelerin %5'ini oluşturur. Nispeten nadir olmasına rağmen yıkıcı etkileri nedeniyle major etkiye sahiptir. Hastaların üçte biri ölür ve üçte biri yardıma mühtaç kalmaktadır (Bakker & Ruigrok, 2021). Anevrizmanın oluşumu, büyümesi ve kanaması için çeşitli risk faktörler tanımlanmıştır (Texakalidis et al., 2019). Gelişen komplikasyonlarda aSAK'ın mevcut yönetimi, yalnızca görüntüleme ve nörolojik muayeneye dayanmaktadır. Bu yönetim genellikle optimal tedavilerin kaçırılmasıyla sonuçlanan, "bekle gör" yöntemi ile takip altında tutulur. Ayrıca görüntüleme ve nörolojik muayene, ciddi bir komplikasyonun başlamasından önce patolojik ve nörolojik değişiklikleri etkili bir şekilde tanımlamayabilir. Bu zorluklar İA'nın tanı ve prognozunda etkili biyomarker'ların bulunmasına olan ihtiyacı göstermektedir (W. X. Wang, Springer, & Hatton, 2021).

MiRNA'ların vasküler bütünlük ve fonksiyonunda temel rolleri üstlendikleri iyi bilinmektedir. MiRNA'lar, hücrel uyaranlara ve patofizyolojik koşullara karşı oldukça hassastır ve apoptoz, nöroinflamasyon, oksidatif stres, beyin ödemi, nöroenez ve anjiyogenez dahil olmak üzere bazı önemli patofizyolojik olayların düzenlenmesinde yer almaktadır. Bu nedenle, vücut sıvılarında miRNA ekspresyon değişikliklerinin, devam eden akut patofizyolojik olaylarını doğrudan yansıtabileceği düşünülmektedir. Bugüne kadar İA'lar için çeşitli immünolojik, genetik, inflamatuvar biyobelirteçlerin yanı sıra anjiyogenez veya hücre adezyonu ile ilişkili faktörleri içeren çalışmalarda İA'ların oluşumunu, ilerlemesini ve yırtılmasını bağımsız olarak tahmin edebilecek, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek biyobelirteçler saptanamamıştır. Ayrıca, rüptüre olan ve rüptüre olmayan İA'ların tanı ve prognozunda daha hassas ve doğru bilgi verme potansiyeli olan non-invaziv sirküle miRNA'ların biyobelirteç olarak değerlendirildiği çalışmalar da çok sınırlıdır. İA'lı hastalarda miRNA ekspresyon değişikliği iyi tanımlanmış olmasına rağmen hastalığa özgü hücrel işlevler ve yollar büyük oranda bilinmemektedir (Mc et al., 2015). Sirküle miRNA'lar ve hedef genlerinin tanımlanması ve ilgili yolların belirlenmesi, hastalığı daha iyi anlayabilmek, sıklığını, morbidite ve mortalite oranını

azaltabilmek için İA'ların ve kanamasının patogenezi ve tedavisine ilişkin detaylı çalışmalara gereksinim vardır.

ESOGÜ Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı ile Nöroloji Anabilim Dalına başvuran İA tanısı alan 12 SAK geçiren olgunun beşinci gününde alınan periferik kan ve BOS'u, 12 SAK geçirmeyen olgunun kanı ve nörolojik olarak patolojik bir bulgusu olmayan 14 kontrol bireyin (toplam 50 örnek) kan ve BOS örnekleri ile yapılan mevcut çalışmada, sirküle miRNA'ların hasta ve kontrol bireylerindeki ekspresyon profillerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması, hastalığa özgü miRNA'ların rüptüre olan ve rüptüre olmayan olgulardaki durumunun saptanması, olgularda bu miRNA'ların prognostik öneminin değerlendirilmesi, kan-BOS miRNA karşılaştırması ile kanın non-invaziv yaklaşım için kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi hedeflenmektedir. Çalışma, elde edilen veriler doğrultusunda miRNA hedefleri olan genler ve ilgili yolakların belirlenmesine, yolaklarda yer alan genlerin değerlendirilmesine yönelik yeni projelere zemin oluşturma potansiyeli taşımaktadır.

SAK geçiren hasta ile kontrol grubu bireylerin periferik kan örneklerinin karşılaştırılmasında, sirküle miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-1297 ve miR-502-5p ekspresyon farklılıkları önemli derecede anlamlı bulunmuştur. Anlamlı farklılıkları saptanan bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, SAK hastalarında kontrollere göre ekspresyon profilinin upregüle olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda bu grupta anlamlı farklılıkları saptanan miRNA'ların AUC değerleri açısından sırasıyla en yüksek miR-200a-3p (AUC=0,929), miR-451a (AUC=0,857), miR-29a (AUC=0,836), miR-1297 (AUC=0,821) ve miR-502-5p (AUC=0,771) olarak bulunmuştur.

SAK geçiren hasta ile kontrol grubu bireylerin BOS örneklerinin karşılaştırılmasında sirküle miR-126, miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR146a-5p ve miR-27b-3p ekspresyon farklılıkları önemli derecede anlamlı bulunmuştur. Anlamlı farklılıkları saptanan bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, SAK hastalarında kontrollere göre miR-126, miR-200a-3p, miR-451a ve miR-146a-5p'nin ekspresyon profilinin upregüle olduğu, buna karşılık miR-29a ve miR-27b-3p'nin SAK örneklerinde downregüle olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda bu grupta anlamlı farklılıkları saptanan miRNA'ların AUC değerleri açısından sırasıyla en yüksek miR-29a (AUC=0,950), miR-451a (AUC=0,900), miR-146a-5p (AUC=0,891), miR-126

(AUC=0,889), miR-200a-3p (AUC=0,889) ve miR-27b-3p (AUC=0,848) olarak bulunmuştur.

SAK geçiren ve SAK geçirmeyen hastaların periferik kan örneklerinin karşılaştırılmasında sirküle miR-126, miR-200a-3p, miR-451a ve miR-502-5p ekspresyonları açısından önemli derecede anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Anlamlı farklılıkları saptanan bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, SAK geçiren vaka örneklerinde geçirmeyenlere göre ekspresyon profilinin upregüle olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda bu grupta anlamlı farklılıkları saptanan miRNA'ların AUC değerleri açısından sırasıyla en yüksek miR-126 (AUC=0,897), miR-200a-3p (AUC=0,855), miR-451a (AUC=0,770) ve miR-502-5p (AUC=0,729) olarak bulunmuştur.

aSAK hastaların periferik kan örneklerinde modifiye rankın skalası karşılaştırıldığında miR-451a'nın ekspresyonu önemli derecede anlamlı bulunmuştur. Anlamlı farklılığı saptanan bu miRNA'nın ekspresyon seviyesi incelendiğinde, mRS 2-6 da mRS 1'e göre ekspresyon profilinin downregüle olduğu gözlemlenmiştir (AUC=0,960). Bu grupta miR-27b-3p ekspresyonu, mRS skor 2-6'da mRS 1'e göre downregüle olduğu ancak ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği görülmüştür (AUC=0,860, p=0,006).

5.1. MiR-126 Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

Yang ve ark. 79 rüptüre olan İA ve 23 rüptüre olmayan İA hastasının serum örneği ile yaptıkları çalışmada, İA'lı hasta ve kontrol grubu karşılaştırmasında hasta grubunda miR-126 ekspresyonunun anlamlı olarak upregüle olduğunu göstermişlerdir (p<0.05). ROC analizi sonucunda sensivite %93.75, spesivite %88.24 ve AUC değeri ise 0,966 olarak saptanmıştır. Rüptüre olan ve rüptüre olmayan İA gruplarının klinik veri karşılaştırmasında; yaş, sigara içme öyküsü, lezyon boyutu ve miR-126 ekspresyonunun İA kanamasını etkileyen risk faktörleri olduğu saptanmıştır. Analizlerde lezyon boyutu ve miR-126 ekspresyonu, İA'lı hastaların kanamasında bağımsız risk faktörleri oldukları gözlenmiştir. Lezyon boyutu ve miR-126 ekspresyonun AUC tanı değerleri sırasıyla; 0,707 ve 0,827 olarak bulunmuştur. GO ve KEGG analizinde miR-126'nın hedef genleri nükleus, transkripsiyon, template DNA, transkripsiyon faktörü aktivitesi, sekans-spesifik DNA bağlanma, protein bağlanma ve fosfatidilinositol gibi 169 biyolojik süreçte yer aldıkları

bildirilmiştir. KEGG analizinde miR-126'nın hedef genleri, MAPK sinyal yolağı, kanser yolağı, ErbB sinyal yolağı ve tiroid hormonu sinyal yolağını düzenlediği ortaya konulmuş, miR-126'nın, *VEGF*'yi hedefleyerek İA oluşumuna katıldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada yüksek miR-126 ekspresyonu olan hastaların daha büyük lezyonlara sahip oldukları ve anjiyogenezi destekleyerek, lezyonların büyümesinde etkili olan miR-126'nın artan ekspresyonu ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu veriler doğrultusunda miR-126'nın, İA oluşumu ve kanamasında potansiyel tanı ve prediktif biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Yang et al., 2020).

Diğer bir çalışma olan Zhu ve ark.'nın çalışmasında; intraserebral kanama tanılı hastalarda, kanamanın birinci gününde alınan serum örneklerinde tüm genom miRNA profillenmesi gerçekleştirilmiş, olgularda kontrollere göre miR-126 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı gözlenmiş ve RT-PCR ile konfirme edilmiştir (kat artışı=0.63, $p<0.01$). Gen fonksiyonel analizinde, miR-126'nın hedef genleri olan *VCAM1*, *SPRED1* ve *PIK3R2*'in intraserebral kanamadan sonra perihematomal ödem oluşumunda yer aldıkları, immün yanıt ve vasküler fonksiyonu ile ilişkili biyolojik süreçlerde rol oynadıkları bildirilmiştir. Korelasyon analizinde serum miR-126'nın perihematomal ödem ile anlamlı düzeyde ilişkisi saptanmış ve perihematomal ödem yönetiminde potansiyel bir biyomarker olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Zhu et al., 2015).

Iwuchukwu ve ark. intraserebral kanamalı hastaların, kanamanın birinci gününde alınan plazma ve BOS örneklerinde yaptıkları çalışmada, BOS'ta plazmaya göre miR-126'nın -8.3 kat downregüle ekspresyonunu tespit etmişlerdir ($p=0.00$). Bu çalışmada miRNA-126'nın azalmış ekspresyonu *VCAM-1* ekspresyonuna yol açarak yaralanma bölgesinde immün hücrelerinin lokalizasyonuna sebep olabileceği öne sürülmüştür (Iwuchukwu et al., 2016).

Lopes ve ark. 27 aSAK geçiren hastanın aSAK sonrası 7-10. günler arasında alınan kan örneğinde yaptıkları NGS çalışmada, aSAK'lı hastalarda kontrollere göre miR-126'nın anlamlı derecede downregüle ekspresyonu gözlenmiştir (-4.65 kat azalış). miRTarBase, DIANA ve mirTargetLink hedef gen analizlerinde *MDM2*, *PMAIP*, *CRK*, *MYC*, *BCL2*, *CCND1*, *PIK3CA*, *TGFBR2* ve *VEGFA*, miR-126'nın hedef genleri olarak tanımlanmıştır. Çalışmada *VEGFA*, trombospondin ve vasküler endotel büyüme faktörü ile ilişkisi nedeniyle aSAK ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Lopes et al., 2018).

Li ve ark. ise İA'lı hastalarında yaptıkları global miRNA profillemeye çalışmasında, rüptüre olmayan İA ve sağlıklı kontroller arasında miR-126'nın anlamlı düzeyde upregüle ekspresyonu gözlenmiştir (14 kat artış, $p=0.025$) (P. Li et al., 2014).

Yaptığımız çalışmada İA ve kontrol grubunun periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon karşılaştırılmasında, rüptüre olan ve rüptüre olmayan İA hastalarında kontrollere göre miR-126 ekspresyonunun azaldığı, ancak miR-126'nın ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p=0,707$, $p=0,733$). Yapılan çalışmalara bakıldığında İA'lı hastaların kan örneklerinde miR-126 ekspresyon düzeyinin hem artma hem de azalma yönünde bir ekspresyon profili sergilediği ve bu değişken ekspresyon seviyelerinin hastalığın oluşum ve kanaması ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Lopes et al., 2018; Yang et al., 2020; Zhu et al., 2015). Ayrıca ekspresyon düzeyi farklılıklarının, kan örneklerinin farklı zamanlarda alınması kaynaklı da olabileceğini düşünmekteyiz.

aSAK ve kontrol BOS grubu karşılaştırılmasında ise miR-126'nın, SAK geçiren grupta kontrol grubuna göre upregüle (47.23 kat artış) ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu miRNA profili hasta grubunda kontrollere göre istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur ($p=0,019$). ROC analizi sonucunda miR-126'nın sensitivitesi %88,89 ve spesivitesi de %100, AUC değeri ise 0,889 (%95 CI:0,610-0,991; $p=0,000$) olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda rüptüre ve rüptüre olmayan gruplar karşılaştırıldığında miR-126'nın rüptüre hastalarda rüptüre olmayan hastalara göre istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı farklılık olduğu (9.43 kat artış) ($p=0,001$) gözlenmiştir, ROC analizi sonucunda miR-126'nın sensitivitesi %100 ve spesivitesi %81,82 ve AUC değeri ise 0,897 (%95 CI:0,692-0,985; $p=0,000$) olarak saptanmıştır.

aSAK hastaların kan ve BOS grubu karşılaştırılmasında, miR-126 ekspresyonunun BOS'ta kana göre 10.38 kat arttığı gözlenmiştir ve istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur (AUC=0,90, $p=0,012$). BOS'taki miRNA profilinin beyin ekstrasellüler sıvısındaki profillere fizyolojik olarak yakın olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, BOS ve kan arasındaki miRNA ekspresyon farklılıkları, nöroinflamasyon ve BBB hasarına yol açan değişmiş bir sistemik inflamatuvar yanıtı yansıtabilmektedir. MiR-126'nın, VCAM1'i hedefleyerek vasküler inflamasyonun artmasına neden oluşu

bilinmektedir ki inflamasyon direkt BBB hasarına yol açarak beyin ödemeine sebep olmaktadır. Bu bilgi ışığında *VCAM1*'in inflamasyon ve anjiyogenezi düzenleyerek kanamaya sebep olduğunu düşünmekteyiz. Iwuchukwu ve ark.'nın çalışmasında plazmaya göre BOS'ta anlamlı ekspresyon azalması saptanması nedeniyle çalışma verilerimizle uyumsuzdur. Ancak ilgili çalışmada 1. günde alınan örnek verileri ile çalışmamızda 5. günde alınan örnek verileri karşılaştırıldığı için farklılık olabileceği, stres ortamının süreç içerisinde ilgili miRNA ekspresyon düzeyi değişikliğinde rol oynayabileceğini düşünmekteyiz (Iwuchukwu et al., 2016).

MiR-126 ekspresyon profilinin olgu klinik özellikleri (Fisher skoru, Hunt-Hess skoru ve mRS) ile karşılaştırıldığımızda, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında, miR-126'yı İA kanamasında bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin hem duyarlılık hem de özgüllük bakımından yüksek olduğu, BOS örneklerinde hasta ve kontrol grubu, ayrıca rüptüre ve rüptüre olmayan İA grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir. Bu veriler, miR-126'nın İA'lı hastaların tanı ve prognozunda bir biyomarker olarak kullanılabileceği hipotezini desteklediğini göstermektedir.

Çalışmamızda miR-126'nın hedef genleri ve ilgili yollarını belirlemede veri tabanlarından yararlanılmıştır. "miRTarBase" veri tabanından miR-126'nın İA ile ilişkili olabilecek güçlü hedef genleri araştırılmıştır. Ek olarak, "Ensembl" veri tabanında bu genlerin biyolojik süreçler ve yolları da belirtilmiştir (Tablo 5.1.). MiRTarBase analizinde miR-126'nın hedef genleri *VEGFA*, *VCAM1*, *SPRED1*, *PIK3R2*, *EGFL7*, *CRKL*, *BCL2* ve *CXCR4* farklı biyolojik süreçlerde yer aldıklarını ve MAPK, inflamasyon, VEGF sinyal yolağı, PI3K/AKT gibi yolları düzenleyerek İA'nın patogenezinde rol oynadığını düşünmekteyiz. Tablo 5.2.'de tartışmadaki miR-126 ile ilişkili çalışmalar ve bizim çalışmamız özetlenmiştir.

Tablo 5.1. Hsa-miR-126-3p'nin hedeflediği bazı genler ve ilgili yolakları

Hedef Gen	Biyolojik Süreç	Yolaklar
VEGFA	Anjiyogenez, vaskülogenez, MAPK kaskad regülasyonu, sinyal iletimi, hücre adezyon regülasyonu	İnflamasyon, sinyal iletimi, hemostaz, VEGF sinyal yolağı
VCAM1	Akut ve kronik enflamatuvar yanıt, hücre adezyonu, hücre-matriks adezyonu, vasküler endotel büyüme faktörü uyarısına hücreyel yanıt	İnflamasyon, ekstrasellüler matriks organizasyonu
SPRED1	Sinyal iletim regülasyonu, anjiyogenez regülasyonu, TGF beta reseptör sinyal yolağı regülasyonu, MAPK kaskad regülasyonu, ERK1 ve ERK2 kaskadın regülasyonu	MAPK, sinyal iletimi
PIK3R2	İmmün yanıt, sinyal iletimi, MAPK kaskad regülasyonu, fosfatidilinositol 3-kinaz aktivitesinin regülasyonu, hücre adezyon regülasyonu	MAPK, inflamasyon, VEGF sinyal yolağı, PI3K/AKT yolağı
EGFL7	Anjiyogenez, vaskülogenez, kan damar gelişimi, hücre adezyonu	-
CRKL	Kan damar gelişimi, sinyal iletimi	İnflamasyon, sinyal iletimi
BCL2	Proliferasyon, apoptoz, immün sistem gelişimi, otofaji regülasyonu, hematopoez	İnflamasyon, apoptoz, sinyal iletimi
CXCR4	Hipoksiye yanıt, apoptoz, immün yanıt, sinyal iletimi, hücre adezyonu	Kemokin reseptör yolağı, sinyal iletimi

Tablo 5.2. MiR-126 ile ilişkili çalışmalar

	Kohort	Örnek Tipi	MiR-126 Ekspresyonu	İA Tanı ve Prognozunda Biyobelirteç
Yang ve ark. (2020)	79 aSAK 23 rüptüre olmayan 80 kontrol	Serum	İA>>Kontrol AUC=0.966	Lezyon boyutu & miR-126 artışı bağımsız risk faktörü
Zhu ve ark. (2015)	33 aSAK 15 kontrol	Serum (1.gün)	aSAK<<Kontrol	Perihematomal ödem yönetiminde potansiyel belirteç
Iwuchukwu ve ark. (2016)	aSAK (5 BOS, 5 plazma)	Plazma:BOS (1.gün)	BOS<< Plazma -8.3 kat azalış	
Lopes ve ark. (2018)	27 aSAK 6 kontrol	Kan (7-10.gün)	aSAK<< Kontrol -4.65 kat azalış	
Li ve ark. (2014)	20 aSAK 20 rüptüre olmayan 20 kontrol Validasyon: 50 kontrol, 93 İA	Kan	Rüptüre olmayan İA >>Kontrol 14 kat artış	
ÇALIŞMAMIZ	İA (rüptüre, rüptüre olmayan):kontrol	Kan	IA< Kontrol	BOS: hasta ve kontrol grubu ayırımı Rüptüre ve rüptüre olmayan İA grubu ayırımı İA'lı hastaların tanı ve prognozunda potansiyel biyomarker
	aSAK:Kontrol	BOS	aSAK>>> Kontrol 47.23 kat artış AUC=0,889	
	Rüptüre:Rüptüre olmayan	Kan	Rüptüre >> Rüptüre olmayan 9.43 kat artış AUC=0,897	
	aSAK	Kan:BOS	BOS >> Kan 10.38 kat artış AUC=0,90	

5.2. MiR-29a Ekspresyon Profiline Değerlendirilmesi

Wang ve ark.'nın 165 İA'lı plazma örneği ile yaptıkları çalışmada, hasta grubunda miR-29a ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. ROC analizi sonucunda sensitivite %80,6, spesivite %94,1 ve AUC değeri ise 0,992 olarak saptanmıştır. MiR-29a ekspresyon düzeyleri ile klinik özellikler birlikte değerlendirildiğinde; miR düzeyi ile, Glasgow Prognoz Skoru'yu, hipertansiyon öyküsü, anevrizma lokasyonu, kanama ve Hunt-Hess seviyesi arasında yakın ilişki olduğu bildirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 165 hastanın beşi, üç yıl boyunca takip edilmiş ve düşük miR-29a ekspresyonunun daha uzun sağkalım ile ilişkili oldukları gözlenmiştir. Bu çalışmada miR-29a'nın inflamasyon yanıt yoluyla İA gelişimine dahil olabileceği aşırı miR-29a ekspresyonunun hücre dışı matriksin düzenlenmesi yoluyla damar duvarını zayıflatarak kanamaya neden olabileceği, bu nedenle İA'nın tanı ve prognozunda etkili bir biyomarker olarak işlev görebileceğini de vurgulamışlardır (W. H. Wang et al., 2016).

Zhao ve ark. miR-29a'nın İA patogeneziindeki rolünü ve altta yatan mekanizmalarını araştırdıkları çalışmalarında, İA hasta ve kontrol grubu karşılaştırmasında, mitokondriyal apoptoz yolağında yer alan kaspaz-3, -8 ve -9 genleri ile sitokrom c ve *Mcl-1* protein düzeylerinin İA hastalarında arttığını göstermişlerdir. *In vitro* deneylerinde, miR-29a'nın azalmış ekspresyonunun, insan beyin vasküler düz kas hücre (HBVSMC) apoptozunu azalttığı, miR-29a'nın artmış ekspresyonunun ise HBVSMC'lerin apoptozunu arttırdığı ve *Mcl-1*'in, miR-29a'nın doğrudan hedef geni olduğunu ortaya koymuşlardır. *In vivo* İA deneylerinde de miR-29a aşırı ekspresyonunun, mitokondriyal yolak yoluyla apoptozu düzenleyebileceğini konfirme etmişlerdir. Bu çalışmada miR-29a'nın mitokondriyal apoptotik yolaklarını düzenleyerek İA'nın ilerlemesinde katkıda bulunabileceği ve İA'da potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini öne sürmüşlerdir (Zhao et al., 2018).

Bache ve ark.'nın çalışmasında aSAK sonrası beşinci günde alınan BOS örneğinde, DCI (Delayed cerebral ischemia) pozitif ve negatif olgular ile nörolojik olarak normal kontrol olgularının miRNA ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır. SAK hastalarında miR-29a'nın istatistiksel anlamlılık düzeyinde artan ekspresyon profili gözlenmiştir (38.3 kat

artış, $p<0.001$). DCI gelişiminde miR-29a ekspresyon seviyesinde anlamlı farklılık saptanmamıştır (Bache et al., 2017).

Liao ve ark. İA tanılı hastalarda yaptıkları yeni nesil sekanslama çalışmasında eksozom miRNA'lar incelenmiştir. İA'lı hasta ve kontrol grubu karşılaştırmasında hasta grubunda miR-29a ekspresyonunun anlamlı olarak upregüle olduğunu göstermişlerdir ($p<0.001$). ROC analizi sonucunda AUC değeri ise 0,791 olarak saptanmıştır. aSAK ve SAK geçirmeyen gruplar arasında miR-29a ekspresyon seviyesinde anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu çalışmada miR-29a'nın İA'nın gelişimine dahil olabileceğine, İA'nın tanısında biyomarker olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Liao et al., 2020).

Yaptığımız çalışmada aSAK ve kontrol grupları periferik kan miRNA ekspresyon karşılaştırmasında, miR-29a ekspresyonunun SAK geçiren olgularda istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı olan 6.22 kat artışı tespit edilmiştir ($p=0,033$). ROC analizi sonucunda da miR-29a'nın sensitivitesi %90 ve spesivitesi %71,43 ve AUC değeri ise 0,836 (%95 CI:0,580-0,967; $p=0,002$) olarak saptanmıştır. Verilerimiz literatürle uyumlu olup, miR-29a ekspresyon artışının İA'nın tanı ve prognozu dahil olabileceğini desteklediği görülmektedir (Liao et al., 2020; W. H. Wang et al., 2016; Zhao et al., 2018). İA gelişimi çeşitli patolojik faktörlerden etkilenebilir. MiR-29 ailesi, hücre dışı matriksin anahtar modülatörüdür. Hücre dışı matriksin degradasyonu, İA oluşumu, ilerlemesi ve kanamasında temel bir bileşen olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, aSAK hastalarının serumunda yüksek MMP-9 seviyelerin bulunduğu bildirilmiştir. Bu bilgiler ışığında miR-29a overekspresyonu, hücre dışı matriksin düzenlenmesi yoluyla damar duvarını zayıflatarak kanamaya neden olabileceğini, bu nedenle İA prognozu üzerinde etkisi olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda aSAK ve kontrol grupları BOS örnekleri karşılaştırıldığında, miR-29a, SAK geçiren grupta downregüle (3.74 kat azalış) ekspresyonu gözlenmiştir. Bu miRNA profilinin hasta grubunda kontrollere göre istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur ($p=0,002$). ROC analizi sonucunda miR-29a'nın sensitivite %90 ve spesivite %100 ve AUC değeri ise 0,950 (%95 CI:0,691-1,000; $p=0,000$) olarak saptanmıştır. MiR-29a'nın azalmış ekspresyonu proksimal tübül hücrelerinde aşırı kollajen IV birikim riskinin artması ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum miR-29a'nın vasküler duvarın esnekliğinden sorumlu olan kollajen ekspresyonunu tersine düzenleyerek İA ilerlemesine

katılabileceğini düşündürmektedir (W. H. Wang et al., 2016). Bache ve ark.'nın çalışması bizim sonuçlarla çelişkilidir. Çalışmamızda normal sağlıklı bireylerden BOS alınamayacağı için, kontrol BOS grubu olarak idiopatik normal basınçlı hidrosefali bireylerinden alınan örnekler kullanılmıştır. Bu durumda ekspresyon farklılıkları, kontrol BOS örneklerinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

SAK geçiren ve geçirmeyen hastaların kanda miRNA ekspresyon profilleri karşılaştırılmasında, SAK geçiren hastalarda miR-29a ekspresyonunun arttığı, ancak ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p=0,152$). Buna rağmen, ROC analizinde miR-29a'nın duyarlılığı %80, özgüllüğü %70 ve AUC değeri de 0,770 (%95 CI:0,0,530-0,926; $p=0,014$) olarak saptanmıştır. Bu veriler, miR-29a ekspresyon düzeyinin İA kanamasına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

aSAK hastaların kan ve BOS grubu karşılaştırılmasında, miR-29a ekspresyonunun BOS'ta kana göre 25.68 kat azaldığı gözlenmiştir ve istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur (AUC=1, $p=0,000$). BOS'taki miRNA profilinin beyin ekstrasellüler sıvısındaki profillere fizyolojik olarak yakın olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, BOS ve kan arasındaki miRNA ekspresyon farklılıkları, nöroinflamasyon ve BBB hasarına yol açan değişmiş bir sistemik inflamatuvar yanıtı yansıtabilmektedir.

Kan ve BOS örneklerinden elde ettiğimiz bulgulara göre, miR-29a'yı bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin hem duyarlılık hem de özgüllük bakımından yüksek olduğu, hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir. Bu veriler hem kan hem de BOS örneğinde miR-29a'nın İA hastalarının tanı ve prognozunda bir biyomarker olarak kullanılabileceği hipotezini desteklediğini göstermektedir. Tablo 5.3.'te gösterildiği gibi miRTarBase veri tabanından miR-29a'nın İA ile ilişkili olabilecek güçlü hedef genleri araştırılmıştır. Ek olarak, "Ensembl" veri tabanında bu genlerin biyolojik süreçler ve yolları da belirtilmiştir. MiRTarBase analizinde miR-29a'nın hedef genleri *MCL1*, *MDM2*, *ICAM1*, *COL4A2*, *COL4A1*, *BCL2* ve *VEGFA*, *PIK3R2* farklı biyolojik süreçlerde yer aldıklarını ve inflamasyon, apoptoz, ekstrasellüler matriks düzenlenmesi yoluyla İA'nın gelişimi ve kanamasına katkıda bulunabileceğini yorumlayabiliriz. Tablo 5.4.'te tartışmadaki miR-29a ile ilişkili çalışmalar ve bizim çalışmamız özetlenmiştir

Tablo 5.3. Hsa-miR-29a-3p'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolları

Hedef Gen	Biyolojik Süreç	Yolaklar
MCL1	Apoptoz, hücre farklılaşması, hücre homeostaz, sitokine yanıt, otofaji regülasyonu	PI3K/AKT yolağı, inflamasyon
MDM2	Kan damar gelişimi, kan damar yeniden şekillenme, apoptoz, hücre döngüsü regülasyonu	PI3K/AKT yolağı, hücre döngüsü, sinyal iletimi
ICAM1	Hücre adezyonu	İnflamasyon
COL4A2 COL4A1	Anjiyogenez, ekstrasellüler matriks organizasyonu, kan damar duvar morfolojisi	Ekstrasellüler matriks organizasyonu, sinyal iletimi
BCL2	Proliferasyon, apoptoz, immün sistem gelişimi, otofaji regülasyonu, hematopoez	İnflamasyon, apoptoz, sinyal iletimi
VEGFA	Anjiyogenez, vaskülogenez, MAPK kaskad regülasyonu, sinyal iletimi, hücre adezyon regülasyonu	İnflamasyon, sinyal iletimi, hemostaz, VEGF sinyal yolağı
PIK3R2	Hücre-matriks adezyon regülasyonu, immün yanıt, apoptoz regülasyonu, sinyal iletimi	RAF/MAP kinaz yolağı, PI3K/AKT yolağı, inflamasyon, hücre iletimi, VEGF sinyal yolağı

Tablo 5.4. MiR-29a ile ilişkili çalışmalar

	Kohort	Örnek Tipi	MiR-29a Ekspresyonu	İA Tanı ve Prognozunda Biyobelirteç
Wang ve ark. (2020)	165 İA 220 Kontrol	Plazma	İA>>Kontrol AUC:0.992 miR-29a↓=uzun sağkalım	Kanama ve Hunt-Hess skoru ile ilişkili Sağkalım ile ilişkili İA tanı ve prognozunda biyobelirteç
Zhao ve ark. (2018)	İA	Kan Hücre Doku		İA ilerlemesinde etkili
Bache ve ark. (2017)	27 aSAK 10 Kontrol	BOS (5.gün)	aSAK>>Kontrol 38.3 kat artış	
Liao ve ark. (2020)	İA:kontrol aSAK:SAK geçirmeyen	KAN (eksozomal miRNA)	İA>>Kontrol AUC: 0,791	İA'nın tanı ve prognozunda biyomarker
ÇALIŞMAMIZ	aSAK:Kontrol	Kan	aSAK>>Kontrol 6.22 kat artış AUC=0,836	İA ilerlemesi ve kanamasında etkili İA'lı hastaların tanı ve prognozunda potansiyel biyomarker
	aSAK:Kontrol	BOS	aSAK<<Kontrol 3.74 kat azalış AUC=0,950	
	aSAK:SAK geçirmeyen	Kan	aSAK>SAK geçirmeyen AUC=0,770	
	aSAK	Kan:BOS	BOS<<Kan 25.68 kat azalış AUC=1	

5.3. MiR-200a-3p Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

Meeuwsen ve ark. 15 aSAK hastanın plazma örneği ile yaptıkları PCR Array miRNA profillenme çalışmasında, aSAK hasta ve kontroller arasında anlamlı farklılık gösteren üç miRNA tanımlamışlardır. Bunlar sırasıyla; miRNA-200a-3p, miRNA-183-5p ve miRNA-2355-3p'dir. aSAK hastalarında miR-200a-3p ekspresyonunun 1.6 kat arttığı gözlenmiştir ($p=0,000$). Bu çalışmada ROC analizi sonucunda AUC değeri 0,74 (95% CI 0.55-0.94) olarak saptanmıştır. SAK geçiren, geçirmeyen ve sağlıklı kontrollerden oluşan validasyon grubunda, farklı ekspresyonu bulunan miRNA'ların konfirmasyonunda, aSAK hastalarında miR-200a-3p'nin kontrollere göre anlamlı derecede upregüle olduğu konfirme edilmiştir (1.8 kat artış, $p=0,02$). Ayrıca miR-200a-3p ekspresyon düzeyinin sadece rüptüre olan hastalarında arttığını, rüptüre olmayan hastalarında artış olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle bu miRNA'nın anevrizmal kanama riskine ilişkin belirteç olabileceğini öne sürmüşlerdir. İA gelişimi ve kanamasında yer alan *PDS5B* ve *CXCL12*, miR-200a-3p'nin hedef genleri olarak tanımlanmıştır. Bu miRNA'nın İA patogenezinde yer alan hücre proliferasyonu (*PDS5B*) ve inflamasyon (*CXCL12*) yollarına ait genleri hedeflediğini bildirmişlerdir. Bu veriler ışığında miR-200a-3p'nin İA'nın tanı ve prognozunda biyomarker olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Meeuwsen et al., 2017).

Yaptığımız çalışmada miR-200a-3p ekspresyonu, aSAK ve kontrol grubunun periferik kan ve BOS örneklerinde karşılaştırılmıştır. Hem kan hem de BOS örneklerinde miR-200a-3p ekspresyonu aSAK grubunda kontrollere göre sırasıyla 19.66 kat ve 9.75 kat arttığı tespit edilmiştir. Bu miRNA'nın ekspresyon profili hasta grubunda kontrollere göre istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur ($p=0,002$, $p=0,019$). ROC analizi sonucunda miR-200a-3p'nin periferik kandaki sensitivite %90 ve spesivite %85,71 ve AUC değeri ise 0,929 (%95 CI:0,696-0,997; $p=0,000$), BOS'ta sensitivite %77,78 ve spesivite %100 ve AUC değeri ise 0,889 (%95 CI:0,610-0,991; $p=0,000$) olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda SAK geçiren ve geçirmeyen grup karşılaştırmasında, miR-200a-3p'nin SAK geçiren hastalarda SAK geçirmeyen hastalara göre istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı ($p=0,005$) bir artış (11.47 kat) gösterdiği (ROC analizi sensitivite %90, spesivite %81,82, AUC 0,855 (%95 CI:0,633-0,968; $p=0,000$)) bulunmuştur. Bu veriler

Meeuwsen ve ark.'nın İA hastalarla yaptıkları çalışma sonuçları ile uyumlu olup, miR-200a-3p'nin tanı ve prognozu yönündeki bilgileri desteklediği görülmektedir.

Elde ettiğimiz bulgulara göre, miR-200a-3p'yı bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin hem duyarlılık hem de özgüllük bakımından yüksek olduğu, hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir. Bu veriler miR-200a-3p'nin İA hastalarının tanı ve prognozunda bir biyomarker olarak kullanılabileceği hipotezini desteklediğini göstermektedir.

Tablo 5.5.'te gösterildiği gibi miRTarBase veri tabanından miR-200a-3p'nin İA'nın patogenezi ile ilişkili olabilecek güçlü hedef genleri araştırılmıştır. Ek olarak, "Ensembl" veri tabanında bu genlerin biyolojik süreçler ve yolakları da belirtilmiştir. MiRTarBase analizinde miR-200a-3p'nin hedef genleri *CTNNB1* ve *TGFB1*, vaskülogenez, damar gelişimi, damar morfogenezi, enflamatuar yanıt, hücre proliferasyon ve sinyal iletimi gibi farklı biyolojik süreçlerde yer aldıklarını ve inflamasyon, apoptoz, ekstrasellüler matriks düzenlenmesi ve VEGF sinyal yolağı yoluyla İA'nın ilerlemesi ve kanamasına katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz. Tablo 5.6.'de tartışmadaki miR-200a-3p ile ilişkili çalışmalar ve bizim çalışmamız özetlenmiştir.

Tablo 5.5. Hsa-miR-200a-3p'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolakları

Hedef Gen	Biyolojik Süreç	Yolaklar
CTNNB1	Kan damar morfogenezi, vaskülogenez, damar gelişimi, mezenkimal hücre proliferasyon regülasyonu, hücre adezyonu, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hematopoez, apoptoz regülasyonu, düz kas hücre farklılaşması	WNT, apoptoz, inflamasyon, hücre iletimi, VEGF sinyal yolağı
TGFB1	Vaskülogenez, enflamatuar yanıt, sinyal iletimi, hücre proliferasyon, hücre döngüsü regülasyonu, hücre dışı matriks	İnflamasyon, hücre iletimi, TGF beta reseptör sinyal, hücre dışı matriks organizasyonu

Tablo 5.6. MiR-200a-3p ile ilişkili çalışmalar

	Kohort	Örnek Tipi	MiR-200a-3p Ekspresyonu	İA tanı ve Prognozunda Biyobelirteç
Meeuwsen ve ark. (2017)	aSAK:Kontrol 15 aSAK 15 Kontrol	Plazma	aSAK>>Kontrol 1.6 kat AUC=0,74	Anevrizmal kanama riskine ilişkin belirteç İA'lı hastaların tanı ve prognozunda potansiyel biyomarker
	Rüptüre olan:Rüptüre olmayan	Plazma	Rüptüre>>Rüptüre olmayan 1.8 kat artış	
ÇALIŞMAMIZ	aSAK:Kontrol	Kan	aSAK>>Kontrol 19.66 kat artış AUC=0,929	İA'nın ilerlemesi ve kanamasına katkıda bulunması İA'lı hastaların tanı ve prognozunda potansiyel biyomarker
	aSAK:Kontrol	BOS	aSAK>>Kontrol 9.75 kat artış AUC=0,889	
	Rüptüre olan:Rüptüre olmayan	Kan	Rüptüre>>Rüptüre olmayan 11.47 kat artış AUC=0,855	

5.4. MiR-451a Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

Li ve ark., İA tanılı hastalarda yaptıkları global miRNA profillemesi çalışmasında, rüptüre olmayan ve sağlıklı kontroller arasında miR-451a'nın anlamlı derecede artan bir ekspresyon profili sergilediğini (15.5 kat artış, $p=0.006$) ve bu verinin konfirme edildiğini bildirmişlerdir (P. Li et al., 2014).

Lopes ve ark. 27 aSAK geçiren hastanın aSAK sonrası 7-10. günler arasında alınan kan örneğinde yaptıkları NGS çalışmalarında ise aSAK'lı hastalarda kontrollere göre miR-451a'nın anlamlı derecede ekspresyonunun azaldığını (-2.24 kat azalış, $p=0.000$). bildirmişlerdir. miRTarBase, DIANA ve mirTargetLink hedef gen analizlerinde *MYC*, *BCL2* ve *PIK3CA*, miR-451a'nın hedef genleri olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada hücre

büyümesi, apoptoz ve metabolizmaya dahil olduğu bilinen *MYC* geni, üç anlamlı farklı eksprese olmuş miRNA'nın (miR-126, miR-451a ve miR-17-5p) hedef geni olarak tanımlanmış ve SAK kompleksinde yer alan önemli bir hedef olduğu öne sürülmüştür (Lopes et al., 2018).

Stylli ve ark. aSAK ve kontrol grubundan alınan BOS örneklerinde miRNA profillerini incelemişler, farklı miRNA paternlerinin vazospazm gelişimi üstündeki etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Çalışma sonucunda SAK hastalarında kontrollere göre önemli oranda miR-451a ekspresyon artışı tespit edilmiştir ($p<0.01$). *MIF*, *CAB39*, *ABCB1*, *AKT1*, *BCL2*, *MYC*, *RAB14*, *TMED7*, *CPNE3*, *RAB5A*, *DCBLD2*, *IL6R*, *IKBKB*, *MMP2* ve *MMP9*, miR-451a'nın hedef genleri olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada MiR-451a'nın aSAK patofizyolojisinde potansiyel bir ana düzenleyici rolü olduğu ortaya konulmuştur (Stylli et al., 2017).

Liao ve ark. İA tanılı hastalarda yaptıkları yeni nesil sekanslama çalışmasında eksozom miRNA'lar incelenmiştir. SAK geçiren ve geçirmeyen grupları arasında miR-451a'nın anlamlı derecede upregüle ekspresyonu gözlemlenmiştir (1.74 kat artış, $p=0.000$). Sirküle eksozomal miRNA profillerinin, İA'nın gelişim ve ilerlemesinde non-invaziv bir biomarker olabileceğini desteklediğini vurgulamışlardır (Liao et al., 2020).

Bache ve ark. 63 SAK hastanın BOS örneğinde miRNA profillerini değerlendirerek, bunların gecikmiş serebral iskemi oluşumu ve SAK sonrası klinik şiddeti ve kötü klinik sonuç ile ilişkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda eritrositten oldukça zengin ve hemoliz biyomarkeri olarak önerilen miR-451a'nın yüksek seviyesi, kötü nörolojik durumla (WFNS 4-5) ilişkilendirilmiştir ($p=0,0001$). Ayrıca miR-451a'nın anlamlı derecede artan ekspresyonunun ağır klinik sonuç (mRS 2-6) grubunda yoğunlaştığı bildirilmiştir (Bache et al., 2020).

Yaptığımız çalışmada rüptüre olmayan ve kontrol grubunun periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon karşılaştırılmasında, rüptüre olmayan hastalarında miR-451a ekspresyonunun upregüle olduğu ancak ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p=0,384$). aSAK ve kontrol bireylerinin periferik kan örneklerinde yapılan karşılaştırmada, miR-451a, aSAK grupta kontrol grubuna göre 8.93 kat artan ekspresyon saptanmış ve istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur ($p=0,014$). ROC analizi sonucunda miR-451a'nın (sensivite %90,

spesivite %85,71 AUC değeri 0,857 (%95 CI:0,605-0,976; p=0,000)) ile vakalar arasında ayırım gücüne sahip olduğu saptanmıştır. Lopes ve ark.'nın çalışması bizim sonuçlarla çelişkilidir (Lopes et al., 2018). Ekspresyon farklılıkları, kan örneklerinin farklı zamanlarda alındığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

aSAK ve kontrol BOS grubu karşılaştırıldığında, miR-451a ekspresyonunun aSAK grupta kontrol grubuna göre 7.45 kat arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği (p=0,024), ROC analizi sonucunda miR-451a'nın sensitivitesinin %80 ve spesivitesinin %100, AUC değerinin de 0,900 (%95 CI:0,624-0,994; p=0,000) olması nedeniyle ilgili miRNA ekspresyon seviyesinin gruplar arasında ayırıcı rol oynayabileceğini göstermektedir. MMP-2 ve MMP-9, miR-451'in hedef genleri arasındadır. MMP-2 ve MMP-9, hücre dışı matriksin sıkı bağlantılarını ve bazal membran proteinlerini bozarak immün hücrelerinin yaralanma bölgesine taşınmasını kolaylaştıran kollajenazlar oldukları bilinmektedir. Her ne kadar çalışmamızda ilgili gen ekspresyonlarını analiz etme olanağı olmadığından literatür bilgisi doğrultusunda subaraknoid kanama ve komplikasyonlarının patogeneğinde önemli hedef genler olabileceklerini düşünmekteyiz. Bu konuda ileri analizlerin yapılması gerekmektedir. Çalışma verilerimiz, Stylli ve ark.'nın aSAK hastalarında yaptıkları çalışma sonuçları ile uyumlu olup, miR-451'in tanı ve prognozu yönündeki bilgileri desteklediği görülmektedir.

Çalışmamızda rüptüre olan ve olmayan grup karşılaştırılmasında, miR-451a ekspresyonunun rüptüre hastalarda 5.84 kat arttığı ve istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı (p=0,043) olduğu saptanmıştır. Bu miRNA'nın rüptüre olan ve olmayan hastaların ayırımındaki duyarlılık ve özgüllük değerleri (ROC: sensitivite %80, spesivite %70, AUC: 0,770 (%95 CI:0,530-0,926; p=0,016)) de dikkate alındığında literatürle uyumlu olarak miR-451a'nın, İA gelişim ve ilerlemesinde non-invaziv bir biyomarker olarak kullanılma potansiyeli olabileceğini düşünmekteyiz.

aSAK vakalarının modifiye rankın skalası temel alınarak yapılan değerlendirmede; miR-451'in BOS örneklerinde artış gösterdiği ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Fakat vaka sayısının genişletilerek tekrar değerlendirilmesinin gerekli olduğu görüşüne varılmıştır. Bache ve ark. aSAK vakalarının 3 ay sonraki klinik değerlendirmeleri sonrası BOS'ta miR-451a artışı ile kötü klinik şiddet ilişkisini vurgulamaktadır. Çalışmamızda, her ne kadar istatistiksel anlamlılık göstermese de miR-

451a'nın mRS skor 2-6 olgu grubunda artış göstermesi Bache ve ark.'nın (Bache et al., 2020) verisi ile uyumludur.

Buna karşılık, aSAK vakalarının periferik kan örneklerinde modifiye rankin skalası değerlendirildiğinde, miR-451a ekspresyonunun, mRS skor 2-6'da mRS skor 1'e göre 7.88 kat azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0,016$) (ROC: sensitivite %100, spesivite %80, AUC: 0,960 (%95 CI:0,632-1,000; $p=0,000$)).

Elde ettiğimiz bulgulara göre, miR-451a'yı bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin hem duyarlılık hem de özgüllük bakımından yüksek olduğu, hem kan hem de BOS'ta hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir. Ayrıca aSAK vakaların periferik kan örneklerinde mRS değerlendirildiğinde sakat kalan veya ölen hastalar ile iyileşen hastalar arasında anlamlı güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir (AUC=0,960). Bu veriler miR-451a'nın SAK sonrası klinik sonuç tahmininde (mRS skoru) potansiyel tanı ve prediktif biyomarker olarak kullanılabileceği hipotezini desteklediğini göstermektedir.

Tablo 5.7.'de gösterildiği gibi miRTarBase veri tabanından miR-451a'nın İA ile ilişkili olabilecek güçlü hedef genleri araştırılmıştır. Ek olarak, "Ensembl" veri tabanında bu genlerin biyolojik süreçler ve yolları da belirtilmiştir. MiRTarBase analizinde miR-451a'nın hedef genleri *MIF*, *CAB39*, *IL6R*, *MMP9*, *ADAM10*, *ETS1* ve *CAV1*, anjiyogenez, vaskülogenez, immün yanıt, sinyal iletimi, apoptoz, ekstrasellüler matriks düzenlenmesi gibi farklı biyolojik süreçlerde yer aldıklarını ve inflamasyon, MAPK, VEGF sinyal yoluyla İA'nın ilerlemesi ve kanamasına katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz. Tablo 5.8.'de tartışmadaki miR-451a ile ilişkili çalışmalar ve bizim çalışmamız özetlenmiştir.

Tablo 5.7. Hsa-miR-451a'nın hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolları

Hedef Gen	Biyolojik Süreç	Yollar
MIF	İmmün yanıt, sitokin üretimi regülasyonu, hücre proliferasyon regülasyonu, fosforilasyon regülasyonu, apoptoz regülasyonu	İnflamasyon, interlökin sinyal
CAB39	Sinyal iletimi, peptidil-serin fosforilasyonu, serin/treonin kinaz regülasyonu	mTOR sinyal, inflamasyon, sinyal iletimi
IL6R	Vasküler endotel büyüme faktörü üretimi, sitokine yanıt, MAPK kaskad regülasyonu, düz kas hücre proliferasyon regülasyonu, hücre proliferasyon regülasyonu, fosforilasyon regülasyonu	İnterlökin sinyal, inflamasyon, MAPK
MMP9	Apoptoz, hücre göçü, hücre dışı matriks organizasyonu, kollajen katabolik süreç	İnterlökin sinyal, sinyal iletimi, inflamasyon, hücre dışı matriks organizasyonu, MMP aktivasyonu, kollajen oluşumu ve degradasyonu
ADAM10	Hücre proliferasyon regülasyonu, hücre sinyalizasyonu, hücre dışı matriks parçalama, hücre büyüme ve göçü regülasyonu, monosit aktivasyonu	İnflamasyon, hücre dışı matriks organizasyonu, kollajen degradasyonu, NOTCH sinyal, sinyal iletimi
ETS1	Anjiyogenez regülasyonu, İmmün yanıt, hücre proliferasyon regülasyonu, hücre farklılaşması, apoptoz regülasyonu	Uyarılara hücresel yanıt, strese hücresel yanıt
CAV1	Anjiyogenez, vaskülogenez, düz kas kasılmasının regülasyonu, hipoksiye yanıt, endotel hücre proliferasyon regülasyonu, apoptoz sinyal yolları regülasyonu	WNT, sinyal iletimi, VEGF sinyal

Tablo 5.8. MiR-451a ile ilişkili çalışmalar

	Kohort	Örnek Tipi	MiR-451a Ekspresyonu	İA Tanı ve Prognozunda Biyobelirteç
Li ve ark. (2014)	20 aSAK 20 rüptüre olmayan Validasyon: 50 kontrol, 93 İA	Kan (1.gün)	Rüptüre olmayan>>Kontrol 15.5 kat artış	
Lopes ve ark. (2018)	27 aSAK 6 Kontrol	Kan (7-10.gün)	aSAK<<Kontrol -2.24 kat azalış	
Stylli ve ark. (2017)	20 aSAK 4 Kontrol	BOS	aSAK>>Kontrol	aSAK patofizyolojisinde potansiyel ana düzenleyici
Liao ve ark. (2020)	İA:Kontrol aSAK:SAK geçirmeyen	KAN (eksozomal miRNA)	aSAK>> SAK geçirmeyen 1.74 kat artış	Eksozomal miRNA, İA gelişim ve ilerlemesinde non-invaziv biyomarker
Bache ve ark. (2020)	63 aSAK 11 Kontrol	BOS	miR-451a↑=WFNS 4-5 ve mRS 2-6 ile ilişkili	İA klinik özellikleri ile ilişkili
ÇALIŞMAMIZ	Rüptüre olmayan: Kontrol	Kan	Rüptüre olmayan>Kontrol	İA ilerlemesi ve kanamasında non-invaziv biyomarker SAK sonrası klinik sonuç tahmininde potansiyel tanı ve prediktif biyobelirteç İA'lı hastaların tanı ve prognozunda potansiyel biyomarker
	aSAK:Kontrol	Kan	aSAK>>Kontrol 8.93 kat artış AUC=0,857	
	aSAK:Kontrol	BOS	aSAK>>Kontrol 7.45 kat artış AUC=0,900	
	aSAK:SAK geçirmeyen	Kan	aSAK>> SAK geçirmeyen 5.84 kat artış AUC=0,770	
	aSAK	BOS	mRS 1<mRS 2-6	
	aSAK	Kan	mRS 1>>mRS 2-6 7.88 kat azalış AUC=0,960	

5.5. MiR-146a-5p Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

Supriya ve ark. 40 aSAK olgusu ve kontrol grubunda SAK sonrası birinci günde alınan plazma örneği ile yaptıkları çalışmada miRNA ekspresyon profillerini incelemişler ve anevrizmal kanamanın potansiyel biyomarkerlerini belirlemeye çalışmışlardır. SAK hastalarında kontrollere göre miR-146a-5p'nin (-4.46 kat) anlamlı düzeyde azalmış bir ekspresyon gösterdiğini bildirmişlerdir. MiR-146a-5p'nin AUC değeri 0,917 (95% CI:0.87-0.95; $p<0.0001$) olarak bulunmuştur. Farklı Fisher skorlarına sahip hastalar karşılaştırıldığında, miR-146a-5p ekspresyon seviyesinde bir farklılık olmadığı, buna karşılık ölen hastalarda, iyileşme yaşayan hastalara göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Bu miRNA'nın fonksiyonel analizinde, sinyal yollarında yer alan hedef genler, inflamasyon ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada miR-146a-5p'nin SAK tanı ve prognozunda bir biyomarker olabileceğini desteklediğini öne sürmüşlerdir (Supriya et al., 2020).

Lopes ve ark. 26 aSAK geçiren hastanın aSAK sonrası 7-10 günler arasında alınan kan örneklerinin NGS çalışmasında, aSAK'lı hastalarda kontrollere göre miR-146a-5p ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir (2.10 kat artış, $p=0,001$). miRTarBase, DIANA ve mirTargetLink hedef gen analizlerinde *MDM2*, *PMAIP1*, *CDKN1A*, *PTGS2*, *RAC1*, *RBL1* ve *VEGFA*, miR-146a-5p'nin hedef genleri olarak tanımlanmıştır. *VEGFA*, trombospondin ve vasküler endotel büyüme faktörü ile ilişkisi nedeniyle aSAK'ta rol oynadığını bildirmişlerdir (Lopes et al., 2018).

Zhu ve ark. intraserebral kanamalı hastaların serum örnekleri ile yaptıkları tüm genom miRNA çalışmasında, intraserebral hastalarında kontrollere göre miR-146a-5p'nin anlamlı düzeyde downregüle ekspresyonu gözlenmiş ve RT-PCR ile konfirme edilmiştir (0.64 kat azalış, $p<0.01$). Gen fonksiyonel analizinde, miR-146-5p tarafından hedeflenen *SMAD4*, *TRAF6*, *CFH*, *IRAK-1*, *IL-6* ve *IL-8* genleri immün yanıt, oksidatif stres yanıt ve TGF beta reseptör yolak aktivitesi ile ilişkili biyolojik süreçlerde rol oynadıklarını bildirmişlerdir (Zhu et al., 2015).

Yaptığımız çalışmada SAK geçiren grup ile kontrol grubunun periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon karşılaştırılmasında, SAK geçiren hastalarda miR-146a-5p ekspresyonunun upregüle olduğu ancak, ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak

anlamli bir farklılık göstermediği görölmüştür ($p=0,071$). Buna karşılık bu grupların BOS örnekleri karşılaştırıldığında, miR-146a-5p'nin aSAK grubunda 9.45 kat artan ekspresyonu saptanmış ve istatistiksel olarak anlamli farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p=0,013$) (ROC analizi: sensitivite- %90,91, spesivite %80 ve AUC değeri ise 0,891 (%95 CI:0,636-0,989; $p=0,000$)).

Çalışmamızda aSAK vakalarının modifiye rankin skalası ve periferik kan örneklerindeki miRNA karşılaştırılmasında, miR-146a-5p'nin mRS skor 2-6'da mRS skor 1'e göre down-regüle olduğu ancak ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamli bir farklılık göstermediği görölmüştür ($p=1,000$). Bu veri Supriya ve ark.'nın SAK'ta mRS değerlendirmesinde yaptıkları çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermekle birlikte, gruplar arasında anlamli farklılık bulunmamasının örneklem büyüklüğünden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

aSAK hastaların kan ve BOS grubu karşılaştırılmasında, miR-146a-5p ekspresyonunun BOS'ta kana göre 3.69 kat arttığı gözlenmiştir ve istatistiksel olarak önemli derecede anlamli bulunmuştur (AUC=0,884, $p=0,000$). BOS'taki miRNA profilinin beyin ekstrasellüler sıvısındaki profillere fizyolojik olarak yakın olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, BOS ve kan arasındaki miRNA ekspresyon farklılıkları, nöroinflamasyon ve BBB hasarına yol açan değişmiş bir sistemik enflamatuvar yanıtı yansıtabilmektedir.

Elde ettiğimiz bulgulara göre, miR-146a-5p'yi bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, BOS örneklerinde testin hem duyarlılık hem de özgüllük bakımından yüksek olduğu, hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir. Bu veriler (AUC=0,891) miR-146a-5p'nin aSAK hastalarının tanısında bir biyomarker olarak kullanılabileceği hipotezini destekler niteliktedir.

Tablo 5.9.'da gösterildiği gibi miRTarBase veri tabanından miR-146a-5p'nin İA ile ilişkili olabilecek güçlü hedef genleri araştırılmıştır. Ek olarak, "Ensembl" veri tabanında bu genlerin biyolojik süreçler ve yolları da belirtilmiştir. MiRTarBase analizinde miR-146a-5p'nin hedef genleri *TRAF6*, *IRAK1*, *FAS*, *CXCR4* ve *TLR2*, İmmün yanıt, NF- κ B kinaz aktivitesi, interlökin regülasyonu, apoptoz regülasyonu, sinyal iletimi gibi farklı biyolojik süreçlerde yer aldıklarını ve inflamasyon yoluyla İA'nın patogenezinde katkıda

bulunabileceğini düşünmekteyiz. Tablo 5.10.'da tartışmadaki miR-146a-5p ile ilişkili çalışmalar ve bizim çalışmamız özetlenmiştir.

Tablo 5.9. Hsa-miR-146a-5p'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolları

Hedef Gen	Biyolojik Süreç	Yollar
TRAF6	İmmün yanıt, NF- κ B kinaz aktivitesi, IL-12, IL-2, IL-6 üretiminin regülasyonu, apoptoz regülasyonu, sinyal iletimi	İnterlökin sinyal, inflamasyon, sinyal iletimi
IRAK1	Sitokin sinyal yolları regülasyonu, NF- κ B kinaz aktivitesi, MAPK aktivitesinin regülasyonu, immün yanıt, sinyal iletimi, düz kas hücre proliferasyon regülasyonu, IL-1'e yanıt, hipoksiye hücre yanıt	İnterlökin sinyal, inflamasyon, sinyal iletimi
FAS	İmmün yanıt, apoptoz, sinyal iletimi, hipoksiye hücre yanıt	FasL/CD95L sinyal, apoptoz, sinyal iletimi
CXCR4	Hipoksi yanıt, apoptoz, immün yanıt, sinyal iletimi, hücre adezyonu	Kemokin reseptör yolları, sinyal iletimi
TLR2	Hipoksiye yanıt, sitokin üretiminin regülasyonu, immün yanıt, apoptoz, Wnt sinyal yollarının regülasyonu, sinyal iletimi, IL-6, -8, -10, -12, -18 üretiminin regülasyonu, NF- κ B aktivitesinin regülasyonu, MMP sekresyon regülasyonu	İnflamasyon

Tablo 5.10. MiR-146a-5p ile ilişkili çalışmalar

	Kohort	Örnek Tipi	MiR-146a-5p Ekspresyonu	İA Tanı ve Prognozunda Biyobelirteç
Supriya ve ark. (2020)	20 aSAK, 20 Kontrol Validasyon: 88 aSAK, 110 kontrol	Plazma (1.gün)	SAK<<Kontrol -4.46 kat azalış AUC=0,917 Ölen hastalarda= miR-146a-5p↓	İA klinik sonuç (mRS) ile ilişkili SAK tanı ve prognozunda potansiyel biyomarker
Lopes ve ark. (2018)	27 aSAK 6 kontrol	Kan (7-10.gün)	aSAK>>Kontrol 2.10 kat artış	
Zhu ve ark. (2015)	33 aSAK 15 kontrol	Serum (1.gün)	aSAK<<Kontrol 0.64 kat azalış	
ÇALIŞMAMIZ	aSAK:Kontrol	Kan	aSAK>Kontrol	BOS: Hasta ve kontrol grubu ayırımı
	aSAK:Kontrol	BOS	aSAK>>Kontrol 9.45 kat artış AUC:0,891	
	aSAK	Kan	mRS 1>mRS 2-6	
	aSAK	Kan:BOS	BOS>>Kan 3.69 kat artış AUC:0,884	

5.6. MiR-1297 Ekspresyon Profiline Değerlendirilmesi

Lai ve ark. 70 SAK ve kontrol grubunun SAK sonrası üçüncü gününde alınan serum örneği ile yaptıkları çalışmada miRNA profillerini incelemişler, SAK'ın şiddeti ve klinik sonucu ile ilişkisini değerlendirmişlerdir. SAK hastalarında kontrollere göre 13 upregüle miRNA'nın farklı düzeylerde ekspresyonlarını tespit etmişlerdir. RT-PCR'da miR-1297, miR-502-5p ve miR-4320'ye ilişkin anlamlılık göstererek ekspresyon düzeylerini bildirmişlerdir. Bunlar arasında yer alan miR-1297'nin SAK hastalarında kontrollere göre anlamlı düzeyde upregüle ekspresyonu saptanmıştır (AUC=0,950 95% CI: 0.870–0.988; P<0.001). Yüksek miR-1297 seviyesi olan hastalarda daha yüksek WFNS (WFNS 4-5) ve yüksek mRS skoru (mRS skoru 3-6) gözlenmiş ve doğrudan kötü prognozla

ilişkilendirilmiştir ($P<0.001$). *PTEN*, *Cox-2*, *HMGA1*, *AEG-1* ve *EZH2* miR-1297'nin birkaç hedef geni arasında olduğunu ve çeşitli yollarla hücreler işlevi etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada miR-1297'nin; SAK tanısı ve ilerlemesinde bir biyomarker olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (N. S. Lai et al., 2017).

Sheng ve ark. 128 aSAK hastasının serum örneği ile yaptıkları çalışmada ise dört farklı zaman diliminde (24, 72, 168 saat ve 14.gün) miR-1297 ekspresyon düzeylerini incelemiş ve bu miRNA'nın aSAK prognozundaki rolünü değerlendirmişlerdir. SAK hastalarında kontrollere göre miR-1297'nin anlamlı olarak upregüle ekspresyonu saptanmıştır. Ayrıca 24, 72 saat, 7. ve 14. günlerde yapılan analizlerde AUC değerleri sırasıyla; 0,80, 0,94, 0,77, 0,59 olarak bulunmuştur. Yedinci günde miR-1297 ekspresyonunun zirve yaptığını, 7-14. günde anlamlı olarak azaldığını ve serum miR-1297'nin, özellikle aSAK'tan 72 saat sonra, hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliğine sahip olduğunu bildirmişlerdir (AUC=0,94). MiR-1297'nin ekspresyon düzeyinin kötü prognoza sahip aSAK hastalarında, klinik süreci daha iyi olan hastalara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç doğrultusunda miR-1297'nin aSAK'ın patofizyolojik mekanizmasına katıldığı sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada yüksek miR-1297 ekspresyon seviyesinin aSAK gelişimi ve prognoz takibinde potansiyel biyobelirteç olabileceğini bildirmişlerdir (Sheng, Lai, et al., 2018).

Yaptığımız çalışmada SAK geçiren hasta ve kontrol grubu bireylerinde periferik kan örneklerinde miRNA karşılaştırmasında, miR-1297, SAK geçiren grupta kontrol grubuna göre 11.24 kat ekspresyonunun arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı olduğu saptanmıştır ($p=0,025$) (ROC analizi: sensitivite %80, spesivite %71,43,AUC değeri: 0,821 (%95 CI:0,563-0,961; $p=0,002$)). Verilerimiz literatürle uyumlu, SAK hastalarında kontrollere göre miR-1297'nin anlamlı olarak upregüle ekspresyonu saptanmıştır. Bu nedenle aSAK'ın tanısında bir biyomarker olarak kullanılma potansiyeli olabileceğini düşünmekteyiz. MiR-1297 gen ekspresyon modülasyonu, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre çoğalması ve sinyal iletimi yoluyla birçok fizyolojik sürece dahil olduğu bilinmektedir ve bu nedenle miR-1297 moleküler düzeyde hastalık süreçleriyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

aSAK ve kontrol BOS grubu karşılaştırıldığında, SAK hastalarında kontrollere göre miR-1297 ekspresyonunun arttığı, ancak miR-1297'nin ekspresyon seviyesinin istatistiksel

olarak anlamlı bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p=0,492$). Benzer şekilde SAK geçiren ve geçirmeyen hastaların kanda miRNA ekspresyon profilleri karşılaştırılmasında, SAK geçiren hastalarda miR-1297 ekspresyonunun arttığı, ancak ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p=0,059$).

SAK geçiren vakaların periferik kan örneklerinde modifiye rankin skalası karşılaştırılmasında yukarıda özetlenen çalışma verilerinin aksine miR-1297 ekspresyon düzeyinin, mRS skor 2-6'da mRS skor 1'e göre downregüle olduğu, ancak ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p=0,114$). Bu verinin varolan literatür verisi ile uyumsuzluğu örneklem kohortunun sınırlı büyüklükte olmasının yanı sıra, kötü prognoza sahip olgu sayısının azlığından da kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz.

Elde ettiğimiz bulgulara göre, miR-1297'yi bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin hem duyarlılık hem de özgüllük bakımından yüksek olduğu, periferik kan örneğinde hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir. Bu veriler miR-1297'nin İA hastalarının prognozunda ($AUC=0,821$) non-invasiv bir biyomarker olarak kullanılabileceği hipotezini desteklediğini göstermektedir.

Tablo 5.11.'de gösterildiği gibi miRTarBase veri tabanından miR-1297'nin İA ile ilişkili olabilecek güçlü hedef genleri araştırılmıştır. Ek olarak, "Ensembl" veri tabanında bu genlerin biyolojik süreçler ve yolları da belirtilmiştir. MiRTarBase analizinde miR-1297'nin hedef geni *PTEN*, anjiyogenez, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre çoğalması ve sinyal iletimi yollarında birçok farklı süreçte yer almaktadır. Bu nedenle miR-1297 ve *PTEN* ekspresyon düzeylerinin ileri analizlerle değerlendirilmesi gerektiği görüşündeyiz. Tablo 5.12.'de tartışmadaki miR-1297 ile ilişkili çalışmalar ve bizim çalışmamız özetlenmiştir.

Tablo 5.11. Hsa-miR-1297'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolları

Hedef Gen	Biyolojik Süreç	Yollar
PTEN	Anjiyogenez, apoptoz, hücre proliferasyonu, endotel hücre göçü, hücre döngüsü regülasyonu, ERK1 ve ERK2 kaskadların regülasyonu, hipoksiye hücresel yanıt, vasküler düz kas hücre proliferasyonunun regülasyonu	PI3K/AKT, inflamasyon, sinyal iletimi

Tablo 5.12. MiR-1297 ile ilişkili çalışmalar

	Kohort	Örnek Tipi	MiR-1297 Ekspresyonu	İA Tanı ve Prognozunda Biyobelirteç
Lai ve ark. (2017)	60 aSAK 10 Kontrol	Serum (3.gün)	aSAK>>Kontrol AUC=0,950 miR-1297↑=WFNS 4-5, mRS 3-6	SAK şiddeti ile ilişkili SAK tanısı ve ilerlemesinde bir biyomarker
Sheng ve ark. (2018)	128 aSAK 40 Kontrol	Serum (24, 72, 168 saat ve 14.gün)	aSAK>>Kontrol miR-1297↑=Kötü prognoz	aSAK'ın patofizyolojik mekanizmasına katılır aSAK gelişimi ve prognoz takibinde potansiyel biyobelirteç
ÇALIŞMAMIZ	aSAK:Kontrol	BOS	aSAK>Kontrol	aSAK hastaların prognozunda potansiyel non-invasiv biyomarker
	aSAK:Kontrol	Kan	aSAK>>Kontrol 11.24 kat artış AUC=0,821	
	SAK geçiren: SAK geçirmeyen	Kan	SAK geçiren>SAK geçirmeyen	
	aSAK	Kan	mRS 1>mRS 2-6	

5.7. miR-27b-3p Ekspresyon Profiline Değerlendirilmesi

Supriya ve ark. 40 aSAK olgusunun SAK sonrası birinci günde alınan plazma örneği ile kontrol grubu örneklerinin karşılaştırıldığı çalışmada, miRNA ekspresyon profillerini incelemişler ve anevrizmal kanamanın potansiyel biyomarkerlerini belirlemeye çalışmışlardır. SAK hastalarında kontrollere göre miR-27b-3p'nin önemli derecede anlamlı downregüle (-4.05 kat) ekspresyonu saptanmıştır. MiR-27b-3p'nin AUC değeri 0,857 (95% CI: 0.80–0.91; $p < 0.0001$) olarak bulunmuştur. Farklı Fisher skorlarına sahip hastalar karşılaştırıldığında, miR-27b-3p'nin ekspresyon seviyesinde bir farklılık olmadığı, buna karşılık miR-27b-3p'nin ekspresyon seviyelerinin, ölen hastalarda, iyileşme yaşayan hastalara göre anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir. Bu miRNA'nın fonksiyonel analizinde, sinyal yollarında yer alan hedef genler, inflamasyon ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışma miR-27b-3p'nin SAK tanı ve prognozunda bir biyomarker olabileceğini destekler niteliktedir (Supriya et al., 2020).

Yaptığımız çalışmada aSAK hasta ve kontrol grubu bireylerinde periferik kan örneklerinde ilgili miRNA karşılaştırmasında, aSAK hastalarında miR-27b-3p ekspresyonunun upregüle olduğu ancak, ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p=0,088$). aSAK ve kontrol BOS grubu karşılaştırıldığında ise, miR-27b-3p, aSAK grubunda downregüle (0.37 kat) ekspresyonu saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p=0,020$). ROC analizi sonucunda miR-27b-3p'nin sensitivitesi %72,73 ve spesivitesi %100 ve AUC değeri ise 0,848 (%95 CI:0,595-0,973; $p=0,000$) olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda aSAK vakaların periferik kan örneklerinde modifiye rankin skalası karşılaştırılmasında, miR-27b-3p, mRS skor 2-6'da mRS skor 1'e göre downregüle olduğu ancak ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p=0,560$). Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmaması örnekleminin küçük olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. ROC analizi sonucunda miR-27b-3p'nin sensitivitesi %80 ve spesivitesi %80 ve AUC değeri ise 0,860 (%95 CI:0,508-0,991; $p=0,006$) olarak bulunmuştur.

aSAK hastaların kan ve BOS grubu karşılaştırılmasında, miR-27b-3p ekspresyonunun BOS'ta kana göre 11,35 kat azaldığı gözlenmiştir ve istatistiksel olarak

önemli derecede anlamlı bulunmuştur (AUC=0,982, p=0,000). BOS'taki miRNA profilinin beyin ekstrasellüler sıvısındaki profillere fizyolojik olarak yakın olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, BOS ve kan arasındaki miRNA ekspresyon farklılıkları, nöroinflamasyon ve BBB hasarına yol açan değişmiş bir sistemik enflamatuvar yanıtı yansıtabilmektedir.

Elde ettiğimiz bulgulara göre, miR-27b-3p'yi bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin hem duyarlılık hem de özgüllük bakımından yüksek olduğu, hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir. Bu veriler miR-27b-3p'nin İA hastalarının tanı ve prognozunda özellikle bir biyomarker olarak kullanılabileceği hipotezini desteklediğini göstermektedir.

Tablo 5.13.'te gösterildiği gibi miRTarBase veri tabanından miR-27b-3p'nin İA ile ilişkili olabilecek güçlü hedef genleri araştırılmıştır. Ek olarak, "Ensembl" veri tabanında bu genlerin biyolojik süreç ve yolları da belirtilmiştir. MiRTarBase analizinde miR-27b-3p'nin hedef genleri *PPARG*, *FOXO1* ve *VEGFC*, Kan damar gelişimi, anjiyogenez, apoptoz, immün yanıt, sinyal iletimi, vasküler düz kas hücre proliferasyonu gibi farklı biyolojik süreçlerde yer aldıklarını ve inflamasyon, MAPK, VEGF sinyal yoluyla İA'nın ilerlemesi ve kanamasına katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz. Tablo 5.14.'te tartışmadaki miR-27b-3p ile ilişkili çalışmalar ve bizim çalışmamız özetlenmiştir.

Tablo 5.13. Hsa-miR-27b-3p'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolları

Hedef Gen	Biyolojik Süreç	Yollar
PPARG	Hücre proliferasyon regülasyonu, apoptoz regülasyonu, immün yanıt, sinyal iletimi, hipoksiye hücresel yanıt, vasküler düz kas hücre proliferasyonun ve apoptozunun regülasyonu, kollajen biyosentetik sürecinin regülasyonu	PTEN, sinyal iletimi, AKT sinyal, intrasellüler sinyal
FOXO1	Kan damar gelişimi, apoptoz, oksidatif strese yanıt, otofaji, hipoksiye yanıt	İnflamasyon, MAPK, PI3K/AKT sinyal yolağı
VEGFC	Anjiyogenez, hipoksiye yanıt, hücre iletimi, kan damar endotel hücre göçünün regülasyonu	VEGF sinyal

Tablo 5.14. MiR-27b-3p ile ilişkili çalışmalar

	Kohort	Örnek Tipi	MiR-27b-3p Ekspresyonu	İA Tanı ve Prognozunda Biyobelirteç
Supriya ve ark. (2020)	20 aSAK, 20 Kontrol Validasyon: 88 aSAK, 110 kontrol	Plazma (1.gün)	SAK<<Kontrol -4.05 kat azalış AUC=0.857 Ölen hastalarda= miR-27b-3p↓	İA klinik sonuç (mRS) ile ilişkili SAK tanı ve prognozunda potansiyel biyomarker
ÇALIŞMAMIZ	aSAK:Kontrol	Kan	aSAK>Kontrol	BOS: hasta ve kontrol grubu ayırımı İA klinik sonuç (mRS) ile ilişkili
	aSAK:Kontrol	BOS	SAK<<Kontrol 0.37 kat azalış AUC=0,848	
	aSAK	Kan	mRS 1>mRS 2-6 AUC=0,860	
	aSAK	Kan:BOS	BOS<<Kan 11.35 kat azalış AUC=0,982	

5.8. MiR-502-5p Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

Lai ve ark. kontrol grubunda ve 70 SAK olgusunda SAK sonrası üçüncü günde alınan serum örneği ile yaptıkları mikrodizin çalışmasında, miRNA profillerini incelemişler ve bunların SAK'ın şiddeti ve klinik sonucu ile ilişkisini değerlendirmişlerdir. SAK hastalarında kontrollere göre 13 upregüle miRNA'nın farklı ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir. RT-PCR'da miR-502-5p, miR-1297 ve miR-4320'nin önemli derecede anlamlı ekspresyonları gözlenmiştir. SAK hastalarında kontrollere göre miR-502-5p'nin anlamlı upregüle ekspresyonu görülmüştür (AUC=0,958 95% CI: 0.882–0.992; P<0.001). Yüksek miR-502-5p seviyesi olan hastalarda daha yüksek WFNS (WFNS 4-5) ve yüksek mRS skoru (mRS skoru 3-6) gözlenmiş ve doğrudan kötü nörolojik sonuçla ilişkilendirilmiştir (P<0.001). Bu sonuçlar doğrultusunda miR-502-5p'nin, SAK oluşumu, gelişimi ve onarım süreçlerine katılabileceği öne sürülmüştür. MiR-502-5p'nin NF-κB sinyal yolağını inhibe ettiğini ve TRAF2'yi hedefleyerek IL-1b-aracılı kondrosit hasarını önleyebileceğini, overekspresyonunun IL-1b-aracılı kondrositlerde anti-apoptotik, anti-

katabolik ve anti-inflamatuar etkilere neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada miR-502-5p, SAK'ın tanı, şiddeti ve prognozunda potansiyel bir biyomarker olduğu vurgulanmıştır (N. S. Lai et al., 2017).

Yaptığımız çalışmada aSAK ve kontrol grubunun periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon karşılaştırılmasında, miR-502-5p'nin, aSAK olgu örneklerinde upregüle olduğu (10.60 kat) tespit edilmiştir. Bu miRNA profilinin hasta grubunda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği ($p=0,044$) ve ROC analizi sonucunda miR-502-5p'nin sensitivitesi %80 ve spesivitesi %85,71 ve AUC değeri ise 0,771 (%95 CI:0,508-0,936; $p=0,034$) olarak saptanmıştır. Bu veriler Lai ve ark.'nın SAK hastalarında yaptıkları çalışma sonuçları ile uyumlu olup, miR-502-5P'nin tanı yönündeki bilgileri desteklediği görülmektedir.

aSAK vakaların periferik kan örneklerinde modifiye rankin skalası karşılaştırılmasında, miR-502-5p'nin, mRS skor 2-6'da mRS skor 1'e göre downregüle olduğu ancak ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p=0,429$). Lai ve ark. çalışması verileri ile çalışmamız uyumlu bulunmamıştır. Daha geniş örneklem ile bu verinin değerlendirilmesi gerektiği kanısındayız.

Çalışmamızda rüptüre olan ve olmayan grup karşılaştırılmasında, miR-502-5p'nin rüptüre olan hastalarda upregüle olduğu (10.66 kat) ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p=0,044$). (AUC değeri 0,729 (%95 CI:0,500-0,894; $p=0,047$)). MiR-502-5p'nin, İA kanamasında potansiyel tanı biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. MiR-502-5p'nin hücre döngüsü ilerlemesinin modülasyonu, hücre proliferasyonu ve sinyal iletimi yoluyla birçok fizyolojik sürece dahil olduğu bilinmektedir. Elde ettiğimiz bulgulara göre, miR-502-5p'yi bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin hem duyarlılık hem de özgüllük bakımından yüksek olduğu, hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir. Bu veriler miR-502-5p'nin İA hastalarının tanı ve prognozunda bir biyomarker olarak kullanılabileceği hipotezini desteklediğini göstermektedir.

Tablo 5.15.'te gösterildiği gibi miRTarBase veri tabanından miR-502-5p'nin İA ile ilişkili olabilecek güçlü hedef genleri araştırılmıştır. Ek olarak, "Ensembl" veri tabanında

bu genlerin biyolojik süreç ve yolları da belirtilmiştir. MiRTarBase analizinde miR-502-5p'nin hedef genleri *TRAF6* ve *IFI27*, immün yanıt, NF- κ B kinaz aktivitesi, interlökin regülasyonu ve apoptoz gibi farklı biyolojik süreçlerde yer aldıklarını ve inflamasyon sinyal yoluyla İA'nın ilerlemesi ve kanamasına katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz. Tablo 5.16.'da tartışmadaki miR-502-5p ile ilişkili çalışmalar ve bizim çalışmamız özetlenmiştir.

Tablo 5.15. Hsa-miR-502-5p'nin hedeflediği bazı genleri ve ilgili yolları

Hedef Gen	Biyolojik Süreç	Yollar
TRAF6	İmmün yanıt, NF- κ B kinaz aktivitesi, IL-12, IL-2, IL-6 üretiminin regülasyonu, apoptoz regülasyonu, sinyal iletimi	İnterlökin sinyal, inflamasyon, sinyal iletimi
IFI27	İmmün yanıt, apoptoz	İnflamasyon

Tablo 5.16. MiR-502-5p ile ilişkili çalışmalar

	Kohort	Örnek Tipi	MiR-502-5p Ekspresyonu	İA Tanı ve Prognozunda Biyobelirteç
Lai ve ark. (2017)	60 aSAK 10 Kontrol	Serum (3.gün)	aSAK>>Kontrol AUC=0,958 miR-502-5p $\uparrow$ =WFNS 4-5, mRS 3-6	SAK'ın tanı, şiddeti ve prognozunda potansiyel biyomarker
ÇALIŞMAMIZ	aSAK:Kontrol	Kan	aSAK>>Kontrol 10.60 kat artış AUC:0,771	İA kanamasında potansiyel tanı biyobelirteç İA'lı hastaların tanı ve prognozunda potansiyel biyomarker
	SAK geçiren: SAK geçirmeyen	Kan	SAK geçiren>>SAK geçirmeyen 10.66 kat artış AUC:0,729	
	aSAK	Kan	mRS 1>mRS 2-6	

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, İA tanısı alan 12 SAK geçiren olgunun beşinci gününde alınan periferik kan ve BOS örneği, 12 SAK geçirmeyen olgunun kanı ve nörolojik olarak patolojik bir bulgusu olmayan 14 kontrol bireyin (toplam 50 örnek) kan ve BOS örnekleri incelenmiştir. Real-Time PCR yöntemi kullanılarak belirlenen sirküle miR-126, miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-1297, miR-27b-3p ve miR-502-5p'nin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Olgu ve kontrol grubu bireylerinde, aday sirküle miRNA'lar ekspresyon seviyesi açısından analiz edilmiş olup, İA'da non-invaziv prognostik biyomarker olarak kullanma olasılıkları değerlendirilmiştir.

Çalışma sonucunda:

1. Çalışmanın araştırma ve kontrol gruplarının cinsiyetler açısından farklılık göstermediği gözlenmiştir.
2. SAK geçiren hasta ile kontrol grubu bireylerin periferik kan örneklerinin karşılaştırılmasında, sirküle miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-1297 ve miR-502-5p ekspresyon farklılıkları önemli derecede anlamlı bulunmuştur. Anlamlı farklılıkları saptanan bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, SAK hastalarında kontrollere göre ekspresyon profilinin upregüle olduğu gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıkları saptanan miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR-1297 ve miR-502-5p'nin klinik prognostik biyomarker olarak kullanma olasılıklarını değerlendirdiğimizde, hasta ve kontrol gruplarını ayırt etme güçlerinin yüksek olduğu gözlenmiştir (sırasıyla AUC: 0,836 ($p=0,002$), 0,929 ($p=0,000$), 0,857 ($p=0,000$), 0,821 ($p=0,002$) ve 0,771 ($p=0,034$)).
3. SAK geçiren hasta ile kontrol grubu bireylerin BOS örneklerinin karşılaştırılmasında sirküle miR-126, miR-29a, miR-200a-3p, miR-451a, miR146a ve miR-27b-3p ekspresyon farklılıkları önemli derecede anlamlı bulunmuştur. Anlamlı farklılıkları saptanan bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, SAK hastalarında kontrollere göre miR-126, miR-200a-3p, miR-451a ve miR-146a-5p'nin ekspresyon profilinin upregüle olduğu, buna karşılık miR-29a ve miR-27b-3p'nin SAK örneklerinde downregüle olduğu gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıkları saptanan miR-126, miR-200a-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-29a ve miR-27b-3p'nin klinik prognostik biyomarker olarak

kullanma olasılıkları değerlendirdiğimizde, hasta ve kontrol gruplarını ayırt etme güçlerinin yüksek olduğu gözlenmiştir (sırasıyla AUC: 0,889 (p=0,000), 0,950 (p=0,000), 0,889 (p=0,000), 0,900 (p=0,000), 0,891 (p=0,000) ve 0,848 (p=0,000)).

4. SAK geçiren ve SAK geçirmeyen hastaların periferik kan örneklerinin karşılaştırılmasında sirküle miR-126, miR-200a-3p, miR-451a ve miR-502-5p ekspresyonları açısından önemli derecede anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Anlamlı farklılıkları saptanan bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, SAK geçiren vaka örneklerinde geçirmeyenlere göre ekspresyon profilinin upregüle olduğu gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıkları saptanan miR-126, miR-200a-3p, miR-451a ve miR-502-5p'nin klinik prognostik biyomarker olarak kullanma olasılıklarını değerlendirdiğimizde, rüptüre ve rüptüre olmayan hastaları ayırt etme güçlerinin yüksek olduğu (Sırasıyla AUC: 0,897 (p=0,000), 0,855 (p=0,000), 0,77 (p=0,016) ve 0,729 (p=0,047)) gözlenmiştir. Dolayısıyla periferik kan örneğinde SAK olasılığının öngörülmesinde bu miRNA'ların potansiyel biyobelirteç özelliği taşıdığı sonucuna varılmıştır. Ancak, analizlerin gerçekleştiği kohort büyüklüğü çalışmamızın en önemli kısıtlılıklarından biridir. Daha geniş kohortlarda bu miRNA'ların belirteç açısından değerlendirilmeleri önemlidir.

5. aSAK hastaların periferik kan örneklerinde modifiye rankin skalası karşılaştırıldığında miR-451a'nın ekspresyonu önemli derecede anlamlı bulunmuştur (p=0,016). Anlamlı farklılığı saptanan bu miRNA'nın ekspresyon seviyesi incelendiğinde, mRS 2-6 da mRS 1'e göre ekspresyon profilinin downregüle olduğu gözlemlenmiştir (7.88 kat azalış). Bu grupta miR-27b-3p ekspresyonu, mRS skor 2-6'da mRS 1'e göre downregüle olduğu ancak ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği görülmüştür (p=0,088). MiR-451a ve miR-27b-3p 'nin klinik prognostik biyomarker olarak kullanılma potansiyellerini değerlendirdiğimizde, sakat kalan veya ölen (5 hasta) hastalar ile iyileşen hastalar arasında ayırt etme güçlerinin yüksek olduğu gözlenmiştir (sırasıyla AUC: 0,960 (p=0,000) ve 0,860 (p=0,006)) ve SAK sonrası klinik sonuç tahmininde potansiyel tanı ve prediktif biyomarker olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

6. Subaraknoid kanama geçiren vakaların kan ve BOS örneklerinin karşılaştırılmasında sirküle miR-126, miR-29a, miR-146a-5p ve miR-27b-3p önemli derecede anlamlı bulunmuştur (sırasıyla p=0,012, p=0,00, p=0,010 ve p=0,001). Anlamlı farklılıkları

saptanan bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri incelendiğinde SAK geçiren olguların BOS örneklerinde miR-126 (10,38 kat) ve miR-146a-5p (3,69 kat) ekspresyon düzeylerinin arttığı, buna karşılık miR-29a (25,68 kat) ve miR-27b-3p (11,35 kat) düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Sirküle miR-126, miR-146a-5p, miR-29a ve miR-27b-3p AUC değerleri bakımından yüksek oldukları ve sırasıyla AUC: 0,909 (p=0,000), 1 (p=0,000), 0,884 (p=0,000) ve 0,982 (p=0,000) olarak bulunmuştur. BOS ve kan arasındaki ekspresyon farklılıkları nöroinflamasyon ve kan beyin bariyer hasarına yol açan değişmiş sistemik enflamatuvar yanıtı yansıtabilmektedir. Bu miRNA'lar aSAK'ta altta yatan nöroinflamasyon hakkında bize fikir verebilmektedir (BOS yerine periferik kanda analiz edersek).

7. SAK geçirmeyen hasta ile kontrol grubu bireylerin periferik kan örneklerinin miRNA ekspresyon karşılaştırılmasında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.
8. aSAK vakaların miRNA ekspresyon profillerinin olgu klinik özellikleri (Fiser skoru ve Hunt-Hess skoru) ile karşılaştırılmasında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Kan-BOS miRNA karşılaştırması ile elde ettiğimiz bulgular ışığında, İA hastaların kan örneklerinde sirküle miRNA'ların ekspresyon farklılığının saptanması, yüksek sensitivite, spesivite ve hasta ile kontrol gruplarının ayırt etme güçlerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu da hastalığın prognozunda potansiyel bir non-invaziv biyomarker olarak kullanılabileceklerini düşündürmektedir.

İA'nın tanı ve prognozunda sirküle miRNA'ların biyobelirteç olarak değerlendirildiği çalışmalar çok sınırlı olması nedeniyle çalışmamızın sonucu literatür verisine katkı sağlamaktadır.

Çalışmamızdaki veriler ayrıca subaraknoid kanama dışında iskemik beyin hasar mekanizması (inme) gibi diğer beyin-damar hastalıklarının moleküler araştırmalarında farklı bir yol gösterecektir.

Anevrizma üzerindeki çalışmamız bilindiği kadarıyla Türkiye'de yapılan en kapsamlı ilk genetik çalışma olması ve son bir kaç yıllık süreç içerisinde İA'nın moleküler patogenezinin ortaya konmasına yönelik dünya genelindeki çalışmalara dahil olma, ayrıca klinisyenlere destek sağlama potansiyeli nedeniyle çalışmamızın yaygın etkisi yüksektir.

Sonuç olarak çalışmada elde edilen veriler, İA hastaların moleküler patofizyolojisini açıklamaya katkıda bulunmaktadır ve ileride bu konuda yapılacak çalışmalar için temel oluşturacaktır.

Yaptığımız çalışmanın bazı sınırlılıkları mevcuttur. Bunlar:

1. Çalışma örnekleminin küçük olması. Gelecekte örnek sayısı artırılarak daha geniş çaplı popülasyon ile çalışılması, ilgili sirküle miRNA'ların tanısal ve prognostik doğruluğunu arttırabilir.
2. SAK sonrası farklı günlerde kan alımı. aSAK sonrası vücut sıvılarında miRNA ekspresyon seviyelerinin değiştiği ve dinamik olduğu bilinmektedir. Bu nedenle gelecekte aSAK sonrası farklı günlerde örneklerin değerlendirilmesi, prognostik belirteçlerin belirlenmesine yardımcı olacak ve bu veriler hastalık tedavisine ve komplikasyonların önlenmesine yönelik yaklaşımlara ipucu sağlayabilecektir.
3. Validasyon. MiRNA hedef genleri, hedef veritabanları kullanılarak belirlenmiştir. Ancak ekspresyon düzeyi farklılık gösteren miRNA'ların hedefledikleri genlerin ekspresyon değerlendirmelerinin yapılamaması, yolaklara ilişkin veri toplanamaması çalışmada saptanan verilerin validasyonuna ilişkin önemli bir eksikliktir. Farklı eksprese olan aday miRNA'ların özellikle inflamasyon ile ilişkili sinyal yolaklarını düzenleyerek İA patogeneğinde çok önemli roller oynayabileceğini varsayıyoruz. İleri çalışmalarda bu miRNA'ların hedef genleri ve ilgili yolakların hücre ve hayvan modellerinde doğrulaması, klinik ile ilişki düzeyini aydınlatacaktır.
4. Kullanılan yöntemin rezölasyonu. Gelecekte RNA-seq gibi rezölasyonu yüksek olan yöntemler kullanılarak global miRNA profillenmesi gerçekleştirilebilir, İA ve SAK ile ilişkili novel diagnostik ve prognostik biyomarkerların tanımlanması sağlanabilecektir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alizadeh-Fanalou, S., Khosravi, M., Alian, F., Rokhsartalb-Azar, S., Nazarizadeh, A., Karimi-Dehkordi, M., & Mohammadi, F. (2021). Dual role of microRNA-1297 in the suppression and progression of human malignancies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 141(May), 111863. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111863>
- Bache, S., Rasmussen, R., Rossing, M., Laigaard, F. P., Nielsen, F. C., & Møller, K. (2017). MicroRNA Changes in Cerebrospinal Fluid after Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*, 48(9), 2391–2398. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017804>
- Bache, S., Rasmussen, R., Wolcott, Z., Rossing, M., Møgelvang, R., Tolnai, D., Hassager, C., Forman, J. L., Køber, L., Nielsen, F. C., Kimberly, W. T., & Møller, K. (2020). Elevated miR-9 in Cerebrospinal Fluid Is Associated with Poor Functional Outcome After Subarachnoid Hemorrhage. *Translational Stroke Research*, 11(6), 1243–1252. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00793-1>
- Bai, H., & Wu, S. (2019). Mir-451: A novel biomarker and potential therapeutic target for cancer. *OncoTargets and Therapy*, 12, 11069–11082. <https://doi.org/10.2147/OTT.S230963>
- Bakker, M. K., & Ruigrok, Y. M. (2021). Genetics of Intracranial Aneurysms. *Stroke*, September, 3004–3012. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.032621>
- Bakker, M. K., van der Spek, R. A. A., van Rheenen, W., Morel, S., Bourcier, R., Hostettler, I. C., Alg, V. S., van Eijk, K. R., Koido, M., Akiyama, M., Terao, C., Matsuda, K., Walters, R. G., Lin, K., Li, L., Millwood, I. Y., Chen, Z., Rouleau, G. A., Zhou, S., ... Ruigrok, Y. M. (2020). Genome-wide association study of intracranial aneurysms identifies 17 risk loci and genetic overlap with clinical risk factors. *Nature Genetics*, 52(12), 1303–1313. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00725-7>
- Balacescu, O., Visan, S., Baldasici, O., Balacescu, L., Vlad, C., & Achimas-Cadariu, P. (2019). MiRNA-Based Therapeutics in Oncology, Realities, and Challenges. *Antisense Therapy*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81847>
- Banks, J. L., & Marotta, C. A. (2007). Outcomes validity and reliability of the modified rankin scale: Implications for stroke clinical trials - A literature review and synthesis. *Stroke*, 38(3), 1091–1096. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000258355.23810.c6>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Brenowitz, A. G. R. B. (2017). 乳鼠心肌提取 {HHS} {Public} {Access}. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>.MicroRNA
- Brown, R. D., & Broderick, J. P. (2014). Unruptured intracranial aneurysms: Epidemiology, natural history, management options, and familial screening. *The Lancet Neurology*, 13(4), 393–404. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70015-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70015-8)
- Carcinoma, N., & Lao, T. D. (2020). Therapeutic Molecular Monitoring of treatment. *Processes*.
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2016). The role of miR-126 in embryonic angiogenesis, adult vascular homeostasis, and vascular repair and its alterations in atherosclerotic disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 97, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2016.05.007>
- Ding, L., Ni, J., Yang, F., Huang, L., Deng, H., Wu, Y., Ding, X., & Tang, J. (2017). Promising therapeutic role of miR-27b in tumor. *Tumor Biology*, 39(3). <https://doi.org/10.1177/1010428317691657>
- Du, M., Espinosa-Diez, C., Liu, M., Ahmed, I. A., Mahan, S., Wei, J., Handen, A. L., Chan, S. Y., & Gomez, D. (2022). miRNA/mRNA co-profiling identifies the miR-200 family as a central regulator of SMC quiescence. *IScience*, 25(5), 104169. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104169>
- Etminan, N., Dörfler, A., & Steinmetz, H. (2020). Unruptured intracranial aneurysms—pathogenesis and individualized management. *Deutsches Arzteblatt International*, 117(14), 235–242. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0235>
- Etminan, N., & Rinkel, G. J. (2016). Unruptured intracranial aneurysms: Development, rupture and preventive management. *Nature Reviews Neurology*, 12(12), 699–713. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.150>
- Filardi, T., Catanzaro, G., Mardente, S., Zicari, A., Santangelo, C., Lenzi, A., Morano, S., & Ferretti, E. (2020). Non-coding RNA: Role in gestational diabetes pathophysiology and complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/ijms21114020>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Fu, X. M., Zhou, Y. Z., Cheng, Z., Liao, X. B., & Zhou, X. M. (2015). MicroRNAs: Novel players in aortic aneurysm. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/831641>
- Fu, X., Niu, T., & Li, X. (2019). MicroRNA-126-3p Attenuates Intracerebral Hemorrhage-Induced Blood-Brain Barrier Disruption by Regulating VCAM-1 Expression. *Frontiers in Neuroscience*, 13(August), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00866>
- Gareev, I., Beylerli, O., Yang, G., Izmailov, A., Shi, H., Sun, J., Zhao, B., Liu, B., & Zhao, S. (2021). Diagnostic and prognostic potential of circulating miRNAs for intracranial aneurysms. *Neurosurgical Review*, 44(4), 2025–2039. <https://doi.org/10.1007/s10143-020-01427-8>
- Iwuchukwu, I., Nguyen, D., & Sulaiman, W. (2016). MicroRNA Profile in Cerebrospinal Fluid and Plasma of Patients with Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 22(12), 1015–1018. <https://doi.org/10.1111/cns.12656>
- Jiu, S., Zhu, X., Wang, J., Zhang, C., Mu, Q., Wang, C., & Fang, J. (2015). Genome-Wide Mapping and Analysis of Grapevine MicroRNAs and Their Potential Target Genes. *The Plant Genome*, 8(2), 1–16. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.12.0091>
- Kagele, D. A., & O’Connell, R. M. (2015). MicroRNAs in Hematopoietic Stem Cell Biology. In *MicroRNA in Regenerative Medicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405544-5.00013-7>
- Kamal, N. N. S. B. N. M., & Shahidan, W. N. S. (2020). Non-exosomal and exosomal circulatory MicroRNAs: Which are more valid as biomarkers? *Frontiers in Pharmacology*, 10(January). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01500>
- Kashif, H., Shah, D., & Sukumari-Ramesh, S. (2021). Dysregulation of microRNA and intracerebral hemorrhage: Roles in neuroinflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158115>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kriegel, A. J., Liu, Y., Fang, Y., Ding, X., & Liang, M. (2012). The miR-29 family: Genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiological Genomics*, 44(4), 237–244. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00141.2011>
- Lai, N. S., Zhang, J. Q., Qin, F. Y., Sheng, B., Fang, X. G., & Li, Z. B. (2017). Serum microRNAs are non-invasive biomarkers for the presence and progression of subarachnoid haemorrhage. *Bioscience Reports*, 37(1), 1–10. <https://doi.org/10.1042/BSR20160480>
- Lai, N., Wu, D., Liang, T., Pan, P., Yuan, G., Li, X., Li, H., Shen, H., Wang, Z., & Chen, G. (2020). Systemic exosomal miR-193b-3p delivery attenuates neuroinflammation in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01745-0>
- Li, L., Qi, C., Liu, Y., Shen, Y., Zhao, X., Qin, H., Zhang, Y., & Yu, T. (2021). MicroRNA miR-27b-3p regulate microglial inflammation response and cell apoptosis by inhibiting A20 (TNF- α -induced protein 3). *Bioengineered*, 12(2), 9902–9913. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1969195>
- Li, P., Zhang, Q., Wu, X., Yang, X., Zhang, Y., Li, Y., & Jiang, F. (2014). Circulating microRNAs serve as novel biological markers for intracranial aneurysms. *Journal of the American Heart Association*, 3(5), 1–12. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.000972>
- Li, Y., Li, G., Guo, X., Yao, H., Wang, G., & Li, C. (2020). Non-coding RNA in bladder cancer. *Cancer Letters*, 485(February), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.04.023>
- Liao, B., Zhou, M. X., Zhou, F. K., Luo, X. M., Zhong, S. X., Zhou, Y. F., Qin, Y. S., Li, P. P., & Qin, C. (2020). Exosome-derived miRNAs as biomarkers of the development and progression of intracranial aneurysms. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 27(6), 545–610. <https://doi.org/10.5551/jat.51102>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lopes, K. D. P., Vinasco-Sandoval, T., Vialle, R. A., Paschoal, F. M., Bastos, V. A. P. A., Bor-Seng-Shu, E., Teixeira, M. J., Yamada, E. S., Pinto, P., Vidal, A. F., Ribeiro-Dos-Santos, A., Moreira, F., Santos, S., Paschoal, E. H. A., & Ribeiro-Dos-Santos, Â. (2018). Global miRNA expression profile reveals novel molecular players in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27078-w>
- Luo, J., Zhu, X., Liu, F., Zhao, L., Sun, Z., Li, Y., Ye, L., & Li, W. (2022). *Expression of serum miR-126 in patients with intracranial aneurysm and its relationship with postoperative cerebral vasospasm*. 14(6), 4372–4379.
- Ma, R., Wang, M., Gao, S., Zhu, L., Yu, L., Hu, D., Zhu, L., Huang, W., Zhang, W., Deng, J., Pan, J., He, H., Gao, Z., Xu, J., & Han, X. (2020). MiR-29a Promotes the Neurite Outgrowth of Rat Neural Stem Cells by Targeting Extracellular Matrix to Repair Brain Injury. *Stem Cells and Development*, 29(9), 599–614. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0174>
- Mc, W., Medel, R., As, D., & Ps, A. (2015). Understanding the Role of microRNAs in the Pathogenesis of Intracranial Aneurysms. *J Dis Markers*, 2(4).
- Meeuwssen, J. A. L., Van't Hof, F. N. G., Van Rheenen, W., Rinkel, G. J. E., Veldink, J. H., & Ruigrok, Y. M. (2017). Circulating microRNAs in patients with intracranial aneurysms. *PLoS ONE*, 12(5), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176558>
- Mehta, V. A., Spears, C. A., Abdelgadir, J., Wang, T. Y., Sankey, E. W., Griffin, A., Goodwin, C. R., & Zomorodi, A. (2021). Management of unruptured incidentally found intracranial saccular aneurysms. *Neurosurgical Review*, 44(4), 1933–1941. <https://doi.org/10.1007/s10143-020-01407-y>
- Mijiti, M., Mijiti, P., Axier, A., Amuti, M., Guohua, Z., Xiaojian, C., Kadeer, K., Xixian, W., Geng, D., & Maimaitili, A. (2016). Incidence and predictors of angiographic vasospasm, symptomatic vasospasm and cerebral infarction in chinese patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *PLoS ONE*, 11(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168657>
- Pawlowska, E., Szczepanska, J., Wisniewski, K., Tokarz, P., Jaskólski, D. J., & Blasiak, J. (2018). NF-κB-mediated inflammation in the pathogenesis of intracranial aneurysm and subarachnoid hemorrhage. Does autophagy play a role? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19041245>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Rikhtegar, R., Mosimann, P. J., Rothaupt, J., Mirza-Aghazadeh-Attari, M., Hallaj, S., Yousefi, M., Amiri, A., Farashi, E., Kheyrollahiyan, A., & Dolati, S. (2021). Non-coding RNAs role in intracranial aneurysm: General principles with focus on inflammation. *Life Sciences*, 278(May), 119617. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119617>
- Rouanet, C., & Silva, G. S. (2019). Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: current concepts and updates. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 77(11), 806–814. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20190112>
- Sheng, B., Fang, X., Liu, C., Wu, D., Xia, D., Xu, S., & Lai, N. (2018). Persistent High Levels of miR-502-5p Are Associated with Poor Neurologic Outcome in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurgery*, 116, e92–e99. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.04.088>
- Sheng, B., Lai, N. sheng, Yao, Y., Dong, J., Li, Z. bao, Zhao, X. tong, Liu, J. qiang, Li, X. qin, & Fang, X. gen. (2018). Early serum miR-1297 is an indicator of poor neurological outcome in patients with aSAH. *Bioscience Reports*, 38(6), 1–8. <https://doi.org/10.1042/BSR20180646>
- Stylli, S. S., Adamides, A. A., Koldej, R. M., Luwor, R. B., Ritchie, D. S., Ziogas, J., & Kaye, A. H. (2017). miRNA expression profiling of cerebrospinal fluid in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*, 126(4), 1131–1139. <https://doi.org/10.3171/2016.1.JNS151454>
- Supriya, M., Christopher, R., Indira Devi, B., Bhat, D. I., & Shukla, D. (2020). Circulating MicroRNAs as Potential Molecular Biomarkers for Intracranial Aneurysmal Rupture. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 24(3), 351–364. <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00465-8>
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., & Baltimore, D. (2006). NF-κB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12481–12486. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>
- Tawk, R. G., Hasan, T. F., D’Souza, C. E., Peel, J. B., & Freeman, W. D. (2021). Diagnosis and Treatment of Unruptured Intracranial Aneurysms and Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Mayo Clinic Proceedings*, 96(7), 1970–2000. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.01.005>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Terrinoni, A., Calabrese, C., Basso, D., Aita, A., Caporali, S., Plebani, M., & Bernardini, S. (2019). The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 57(7), 932–953. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0838>
- Texakalidis, P., Sweid, A., Mouchtouris, N., Peterson, E. C., Sioka, C., Rangel-Castilla, L., Reavey-Cantwell, J., & Jabbour, P. (2019). Aneurysm Formation, Growth, and Rupture: The Biology and Physics of Cerebral Aneurysms. *World Neurosurgery*, 130, 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.07.093>
- Thompson, B. G., Brown, R. D., Amin-Hanjani, S., Broderick, J. P., Cockroft, K. M., Connolly, E. S., Duckwiler, G. R., Harris, C. C., Howard, V. J., Johnston, S. C. C. la., Meyers, P. M., Molyneux, A., Ogilvy, C. S., Ringer, A. J., & Torner, J. (2015). Guidelines for the Management of Patients With Unruptured Intracranial Aneurysms: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. In *Stroke; a journal of cerebral circulation* (Vol. 46, Issue 8). <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000070>
- Toth, G., & Cerejo, R. (2018). Intracranial aneurysms: Review of current science and management. *Vascular Medicine (United Kingdom)*, 23(3), 276–288. <https://doi.org/10.1177/1358863X18754693>
- Wang, R.-K., Sun, Y.-Y., Li, G.-Y., Yang, H.-T., Liu, X.-J., Li, K.-F., Zhu, X., & Yu, G.-Y. (2021). MicroRNA-124-5p delays the progression of cerebral aneurysm by regulating FoxO1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(4), 1–8. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10606>
- Wang, W. H., Wang, Y. H., Zheng, L. L., Li, X. W., Hao, F., & Guo, D. (2016). MicroRNA-29a: A potential biomarker in the development of intracranial aneurysm. *Journal of the Neurological Sciences*, 364, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.03.010>
- Wang, W. X., Springer, J. E., & Hatton, K. W. (2021). Micrnas as biomarkers for predicting complications following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179492>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Wang, W. X., Springer, J. E., Xie, K., Fardo, D. W., & Hatton, K. W. (2021). A Highly Predictive MicroRNA Panel for Determining Delayed Cerebral Vasospasm Risk Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.657258>
- Wei, J. W., Huang, K., Yang, C., & Kang, C. S. (2017). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncology Reports*, 37(1), 3–9. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5236>
- Wong, L. L., Wang, J., Liew, O. W., Richards, A. M., & Chen, Y. T. (2016). MicroRNA and heart failure. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/ijms17040502>
- Xue, L., Xiong, C., Li, J., Ren, Y., Zhang, L., Jiao, K., Chen, C., & Ding, P. (2020). MiR-200-3p suppresses cell proliferation and reduces apoptosis in diabetic retinopathy via blocking the TGF- β 2/Smad pathway. *Bioscience Reports*, 40(11), 1–12. <https://doi.org/10.1042/BSR20201545>
- Yang, F., Xing, W. W., Shen, D. W., Tong, M. F., & Xie, F. M. (2020). Effect of miR-126 on intracranial aneurysms and its predictive value for rupture of aneurysms. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(6), 3245–3253. https://doi.org/10.26355/eurev_202003_20691
- Zhang, C., Wang, H., & Yang, B. (2020). miR-146a regulates inflammation and development in patients with abdominal aortic aneurysms by targeting CARD10. *International Angiology*, 39(4), 314–322. <https://doi.org/10.23736/S0392-9590.20.04283-2>
- Zhang, H. L., Li, L., Cheng, C. J., & Sun, X. C. (2018). Expression of MIR-146a-5p in patients with intracranial aneurysms and its association with prognosis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(3), 726–730. https://doi.org/10.26355/eurev_201802_14300
- Zhao, W., Zhang, H., & Su, J. Y. (2018). MicroRNA-29a contributes to intracranial aneurysm by regulating the mitochondrial apoptotic pathway. *Molecular Medicine Reports*, 18(3), 2945–2954. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9257>

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Zhou, S., Dion, P. A., & Rouleau, G. A. (2018). Genetics of intracranial aneurysms. *Stroke*, 49(3), 780–787. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.018152>

Zhu, Y., Wang, J. L., He, Z. Y., Jin, F., & Tang, L. (2015). Association of altered serum micro RNAs with perihematomal edema after acute intracerebral hemorrhage. *PLoS ONE*, 10(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133783>



