



ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HİPERTROFİK KARDİYOMİYOPATİ İLE MİKRO-RNA'LAR ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. MEHMET AKDENİZ

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. Ufuk ERYILMAZ

AYDIN 2013

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HİPERTROFİK KARDİYOMİYOPATİ İLE MİKRO-RNA'LAR ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. MEHMET AKDENİZ

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. Ufuk ERYILMAZ

AYDIN 2013

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TPF-13013 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Kardiyoloji eğitimimi sağlayan değerli tüm hocalarıma; Prof. Dr. Alper Onbaşılı, Prof. Dr. Tarkan Tekten, Prof. Dr. Ceyhun Ceyhan, Yrd. Doç. Dr. Ufuk Eryılmaz, Yrd. Doç. Dr. Çağdaş Akgüllü, Yrd. Doç. Dr. Hasan Güngör, Yrd. Doç. Dr. Cemil Zencir'e, Kalp Damar Cerrahisi, Dahiliye A.B.D. öğretim üyelerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasında bana bilimsel ve akademik desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Ufuk Eryılmaz başta olmak üzere, Yrd. Doç. Dr. Çağdaş Akgüllü'ye ve Genetik Anabilimdalı Başkanı Prof. Dr. Gökay Bozkurt'a ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Hipertrofik Kardiyomiyopati	3
2.1.1. Tanım ve Görülme Sıklığı	3
2.1.2.Patogenez	3
2.1.3. Fizyopatoloji.....	4
2.1.3.1.Diyastol Disfonksiyon.....	4
2.1.3.2. Miyokardiyal iskemi	5
2.1.3.3. Sol Ventrikül Çıkış Yolu Obstrüksiyonu.....	5
2.1.3.4.Anormal Vasküler Yanıt.....	6
2.1.3.5. Aritmi	6
2.1.4. Semptomlar	7
2.1.5.Genetik	7
2.1.6. Klinik Gidiş	8
2.1.7. Tanı	8
2.1.7.1. Fizik muayene	8
2.1.7.2. Elektrokardiyogram	9
2.1.7.3. Ekokardiyografi	9
2.1.7.4. Nükleer görüntüleme.....	10
2.1.7.5. Manyetik Rezonans Görüntüleme.....	11
2.1.7.6. Bilgisayarlı Tomografi	11

2.1.7.7. Genetik Test	11
2.1.7.8. Kardiyak Kateterizasyon ve Biyopsi	12
2.1.8. Tedavi	12
2.2.Mikro-RNA	13
2.2.1.MikroRNA'ların Oluşumu	13
2.2.2.MikroRNA'ların Fonksiyonu	15
2.2.3.Mikro-RNA ve Kalp	16
2.2.4.Serum ve mikro RNA.....	18
 3. MATERYAL VE METOD	 20
3.1.Çalışma Grupları.....	20
3.2. Ekokardiyografik Çalışma	20
3.3. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması	21
3.4.Örneklerin Çalışması	21
3.4.1.RNA izolasyonu	21
3.4.2.RNA miktarlarının ölçümü ve kalite kontrolü	23
3.4.3.miRNA Ekspresyon Analizi.....	23
3.4.4.Tek sarmal cDNA sentezi	24
3.4.5.Gerçek Zamanlı PCR.....	25
3.4.6.Data Analiz	26
3.4.7.Örneklerin Çalışması ve Veri Analizi	26
3.4.8.İstatistiksel Yöntem	27
 4.BULGULAR	 28
 5.TARTIŞMA.....	 32
 ÖZET	 40
ABSTRACT	41
KAYNAKLAR.....	42

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Mikro-RNA Listesi	27
Tablo 2: Cinsiyet-Yaş-Boy-Kilo Dağılımları	28
Tablo 3: Risk faktörleri ve ilaç kullanımı.....	29
Tablo 4: miRNA Ekspresyon Değerleri	30
Tablo 5: LV MASS ve miRNA İlişkisi	31

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: miRNA Sentezi	15
Şekil 2: miRNA'nın Etkilediği Basamaklar	16
Şekil 3: miRNA PCR Analizi.....	23

KISALTMALAR DİZİNİ

- 2B** : İki boyutlu
3B : Üç boyutlu
ACEi : Anjiotensin konverting enzim inhibitörü
AD : Aort darlığı
AF : Atriyal fibrilasyon
AKÖ : Ani kardiyak ölüm
ANP : Atriyal natriüretik peptid
ATP : Adenozin-tri-fosfat
BB: Betablokör
cDNA: Komplementer DNA (Complementary DNA)
DDG: Doku Doppler görüntüleme
DGCR8: DiGeorge sendrom kritik bölge gen 8
DNA: Deoksiribonükleik asit
EF: ejection fraction
Egr-1 : early growth response 1
EKG: Elektrokardiyografi
EKO : Ekokardiyografi
ERK: Extracellular signal-regulated kinas
Exp-5: Eksportin-5 (Exportin-5)
FOXO: Forkhead box
HDAC4 : human histone deacetylase
HKM : Hipertrofik kardiyomiyopati
HT : Hipertansiyon
IGF-1: insulin-benzeri büyüme faktörü
ISO : Isoprotenol
KAH : Koroner arter hastalığı
KKB: kalsiyum kanal blokör
KY : Kalp yetersizliği
LA: left atrium (sol atrium)
LV: left ventricular (Sol ventrikül)

LVH: Sol ventrikül hipertrofisi
LVOT: left ventricular outflow tract (sol ventrikül çıkış yolu)
MAPK: Mitogen-activated protein kinases,
MI: myokard enfaktüsü
miRNA : MikroRNA
MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA : Messenger RNA
MuRF1: muscle specific ring finger protein-1
MY : Mitral yetersizliği
NFATc3 : Nuclear Factor of activated T Cells
NYHA : New York kalp cemiyeti
ORF : open reading fram
PAF : Paroksizmal atriyal fibrilasyon
PCR : Polimeraz Chain Reaksiyon
PET : Pozitron emisyon tomografi
pre-miRNA: Prekürsör miRNA
pri-miRNA: Primer-miRNA
Pttg1 : Pituitary tumor-transforming gene-1
qPCR: Kantitatif PCR
RISC: RNA induced silencing complex
RNA: Ribonükleik asit
rRNA: Ribozomal RNA
SAM: Systolic anterior motion of mitral (sistolik mitral öne hareket)
sirt-1: sirtuin 1
snoRNA: Small nucleolar RNA
snoRNP: small nucleolar ribonucleoprotein
SPAB : Sistolik pulmoner arter basıncı
SPECT: single photon-emission computed tomography
Spry 1: Sprouty homolog 1
TGF- β : dönüştürücü büyüme faktörü- β
TÖE : Transözofajiyal ekokardiyografi
UTR: Translasyon olmayan bölge (Untranslated region)

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kalp kasında oluşan patolojik durumlara genel olarak kardiyomiyopati denir. Kardiyomiyopati kapak hastalığı (aort darlığı, mitral yetersizlik) ve hipertansiyon gibi sistemik hastalıklardan kaynaklanabilir. Kalp kasının kendisinden kaynaklanan kardiyomiyopatiler primer kardiyomiyopati olarak kabul edilir. Hipertrofik kardiyomyopati, dilate kardiyomyopati ve restriktif kardiyomiyopati primer kardiyomiyopatilere örnek olarak verilebilir (1).

Hipertrofik Kardiyomiyopati (HKM), hipertrofiye neden olacak başka bir kardiyak ya da sistemik hastalık olmaksızın ortaya çıkan, sıklıkla artmış kasılma fonksiyonu gösteren, dilate olmamış sol ventrikülün daha çok interventriküler septumunu tutarak myokardiyal hipertrofiye neden olan primer kalp kası hastalığıdır (2). HKM her yaşta görülmekle birlikte en sık 40-50 yaşlarında ortaya çıkar. Hastalık kadın ve erkekleri eşit oranda etkilemektedir. Genel prevalansı % 0,2 olup en sık genetik geçişli kardiyak bozukluktur. Genç yaş grubunda mortalitesi yüksektir. HKM hastaların çoğu asemptomatik olup sıklıkla HKM'li akrabalarının rutin taraması sırasında tanı alırlar. Hastaların ilk semptomu myokard enfarktüsü ya da ani kardiyak ölüm olabilir. Ölüm sıklıkla ani ve beklenmedik şekilde gerçekleşir (3). HKM' ye bağlı yıllık mortalite % 1 olup 14 yaşın altında tanı konan olgularda mortalite % 2-4' dir (4).

Transtoraksal ekokardiyografi HKM hastalarının tanısında önemli yere sahiptir. Sıklıkla interventriküler septum ve sol ventrikül anterolateral duvar tutulsa da bazı vakalarda apeks ve serbest duvar tutulumu da görülebilir. Septumun posterior duvara göre 1,3 –1,5 kat daha kalın olması anlamlıdır. Septum sıklıkla 15 mm'nin üzerindedir (normali 12mm' den az). HKM'li hastaların septumu genellikle 20 mm üzerinde olsa da daha hafif (13 -15mm)-veya daha ciddi (60 mm) olabilir (5,6).

Farmakolojik tedavi (beta blokörler, kalsiyum antagonistleri), ablasyon, miyektomi, kalp pili gibi çok değişik tedavi yöntemleri kullanılması rağmen kesin bir tedavi yöntemi yoktur (7).

Sol ventrikül hipertrofisine neden olan bir diğer hastalık hipertansiyondur. Hipertansiyonun yaşla orantılı olarak tüm dünyada insidansı artmaya devam etmektedir. (ABD' de yapılan NHANES III çalışmasında 60 yaşından sonra hipertansiyonun her iki cins arasında %50'nin üzerinde olduğu ve bunun yaş ilerledikçe daha da arttığı gösterilmiştir. Hipertansiyon sol ventrikül miyokardı üzerine basınç yükü artışına neden olarak hipertrofi

oluşturur. Hipertansiyonda artan hemodinamik yük sistolik veya diyastolik disfonksiyon geliştirebilir ve farklı kalp yetmezliği formlarına (sistolik kalp yetmezliği veya diyastolik kalp yetmezliği) neden olabilir (8,9).

MikroRNA'lar (miRNA) tüm türlerde her zaman sık bir şekilde eksprese edilebilen küçük 18-25 nükleotid uzunluğunda, yüksek derecede korunmuş, kodlanmayan RNA'lardır (10,11). Bu RNA'lar genellikle hedef genlerin endojen represörü olarak görev alırlar. Böylece translasyonu inhibe etmek ve/veya mesajcı RNA'ların (mRNA) yıkımını arttırmak yoluyla veya alternatif olarak translasyonu arttırarak işlev görürler (12,13). Tek bir miRNA'nın gen ifadesini kompleks programını yönetmek için yüzlerce gen kopyasını etkileyebildiği ve böylece hücrelerin fizyolojisinde genel değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (14,15). miRNA'ların kardiyovasküler gelişim ve patofizyolojisi de dahil olmak üzere tüm hücresel süreçlerde anahtar moleküler oyuncu olduğu düşünülmektedir (16,17). Çeşitli çalışmalarda intrasellüler miRNA'ların dağılımındaki değişikliklerin miyokardiyal enfarktüs, hipertrofi, kardiyomiyopati ve aritmi gibi çeşitli kardiyovasküler durumlar ile korelasyon içinde olduğu gösterilmiştir (18-28).

Bu çalışmada klinik ve ekokardiyografik olarak HKM tanısı konulmuş hastalarda, daha önceden literatürde hipertrofi ile ilişkili olabileceği gösterilmiş olan miR-133, miR-1, miR-21 miR-22, miR-23a, miR-29, miR- 30, miR- 34, miR- 199a, miR- 208 ve miR-290'un periferik kanda düzeylerine bakılarak HKM'ye özgü miRNA gruplarının olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmaya, hipertansiyona bağlı sol ventrikül hipertrofisi tanısı konulmuş hastaları da katarak miRNA ilişkisinin hipertrofiiden bağımsız olup olmadığı incelendi. İkincil amaç olarak da özel miRNA grupları ile mortalite arasındaki ilişki irdelendi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Hipertrofik Kardiyomiyopati

2.1.1. Tanım ve Görülme Sıklığı

Hipertrofik kardiyomiyopati; ventrikülde kas kitlesini uyaran başka bir kardiyak veya sistemik hastalık olmadığı halde sol ventrikülde simetrik (konsantrik) veya asimetrik bir hipertrofi olmasıdır (5). İlk hipertrofik kardiyomiyopati (HKM) tanımı, 1958 yılında Donald Teare tarafından kullanılmıştır (29). Hastalık; klinik, morfolojik ve genetik açıdan heterojen olup en sık görülen kalıtsal kardiyovasküler hastalıktır (5).

Hipertrofik kardiyomiyopati prevalansı daha çok Amerika, Japonya ve Çin’de erişkin popülasyonda yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucu yaklaşık %0.2 (1/500) olarak belirlenmiştir (30-32).

2.1.2.Patogenez

HKM’ nin kardiyak sarkomer proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyon sonucu geliştiği gösterilmiştir (33,34). Bu durum HKM’nin hücrenin kontraktıl elemanı olan sarkomer ile ilgili bir hastalık olduğu görüşüne neden olmuştur. Bu hastalıkta kontraktılitenin artmış olduğu yönünde fikir olsa da; Marian AJ tarafından yapılan çalışmalarda çeşitli sarkomer mutasyonlarının, kardiyak miyozitlerde kontraktılitenin azalmasına yol açtığı ve azalmış miyokardiyal kontraksiyonun kompanzatuvar hipertrofiye yol açtığı ileri sürülmüştür (35). Bu hipoteze göre kontraktılideki azalma hücre stresine yol açar ve dolayısıyla miyokartta strese duyarlı trofik ve mitotik faktörlerin (örneğin insulin-benzeri büyüme faktörü (IGF-1), dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), anjiyotensin II, kalsinörin ve endotelin-1) ekspresyonu uyarılır. Bu faktörlerin ekspresyonu miyozit hipertrofisine ve dizilim bozukluğuna, inderstisiyel kollajen sentezinin artmasına ve intramural koroner arterlerin medial tabakasında kalınlaşmaya yol açar. Hipertrofik kardiyomiyopati’ deki azalmış miyokart kontraktılitesine rağmen korunmuş veya artmış sol ventrikül (LV) ejeksiyon fraksiyonu (EF) daha düşük sistol sonu sol ventrikül hacmine yol açan konsantrik tipte hipertrofiye bağlanmıştır (36). Bu hipoteze destekleyici bulgular, in vitro çalışmalarda β -miyozin ağır zinciri ve troponin T mutasyonları bulunan hücrelerde kontraktılitenin azaldığının gösterilmesi ile elde edilmiştir (37,38). Ancak farklı araştırmalarda mutant miyozinlerde artmış enzimatik ve mekanik özelliklerin gözlenmesi ile azalmış kontraksiyon hipotezi tam olarak destek bulamamıştır (39).

Bir diğer hipotez olarak da enerji kaybı hipotezi ileri sürülmüştür. Bu hipotezde mutant sarkomerlerde yetersiz adenozin-tri-fosfat (ATP) yararlanımının enerji gereksinimini arttırdığı ve hücresel enerji bozukluğunun sarkoplazmik retikulumun kalsiyum geri alım pompasının işlevini bozduğu ve böylece hücre içi kalsiyumun artışına sebep olarak kalsiyum bağımlı sinyal yollarını harekete geçirerek hipertrofiyi indüklediği öne sürülmüştür (40). Asimetrik septal hipertrofinin HKM hastalarında daha sık görülmesinin sebebi olarak da septumda daha fazla artmış hücresel enerji bozukluğunun varlığı şeklinde açıklanmıştır (40,41). Hücresel enerji yoksunluğunun iyon pompalarını etkilediği ve enerji ihtiyacının arttığı egzersiz gibi durumlarda, daha sık görülen aritmilere ve ani kardiyak ölüme sebep olduğu düşünülmektedir. Bu hipotez, kardiyak fosfokreatininin ATP'ye oranının farklı gen mutasyonlarına sahip HKM olgularında sağlıklı gruba göre yaklaşık %30 azaldığının gösterildiği bir çalışma ile de desteklenmiştir (42). Sarkomer proteinlerindeki mutasyonun miyofilaman aktivitesini arttırdığı, miyozitlerde hiperkontraktiliteye ve aşırı enerji kullanımına yol açtığı, miyokart enerji düzeylerindeki değişikliklerle birlikte hücresel kalsiyum düzeylerindeki değişikliklerin sinyal yollarını (örneğin Janus-ilişkili kinaz sinyal çeviricileri ve transkripsiyon aktivatörleri (JAK-STAT) sinyal yolu) uyardığı ve böylelikle miyozit gevşemesinin azaldığı, miyozit büyümesi ile birlikte aberan (kusurlu) doku yapısının gelişiminin (dizilim bozukluğu ve miyokardiyal fibrozis) uyarıldığı mekanizma günümüz için önerilen patofizyolojik mekanizmadır (43).

2.1.3. Patofizyoloji

HKM'nin patofizyolojisi şöyle sıralanabilir.

2.1.3.1. Diyastol Disfonksiyon

HKM'li olguların büyük bir kısmında sol ventrikül gevşeme ve doluş anormallikleri saptanır (44). Diyastolik disfonksiyon, efor dispnesi ve nefes darlığı gibi kalp yetersizliği ile ilişkili semptomlardan sorumludur (45,46). Diyastolik disfonksiyonun derecesi sol ventrikül hipertrofisinin ciddiyetinden bağımsızdır (44). HKM'de diyastolün hem aktif hem de pasif fazı bozulmuştur. Erken diyastolde görülen izovolümetrik gevşeme, sarkoplazmik retikulumda enerjiye bağımlı kalsiyum alımını gerektirir ve bu durum HKM'de uzamıştır. Miyozit düzensizliği, hücresel enerji bozukluğu ve mutant sarkomer proteinlerinin kalsiyuma karşı değişmiş ilgisi olası faktörlerdir. Basınçlardaki artış, aktif gevşemenin tamamlanmasından önce gerçekleşen ventrikül dolumunun bir sonucudur. Subendokardiyal iskemi; hem diyastolik disfonksiyon oluşumunda etkilidir, hem de basınç düşüşündeki

gecikmenin koroner kan akımının azalmasına yol açabilmesi nedeniyle diyastolik disfonksiyonun bir sonucudur (47). HKM’de egzersiz sırasında kalp hızının artması ile diyastoldeki dolum süresi azalır. Bu durum bozulmuş kompliyans ile birlikte diyastol sonu hacminde düşüşe neden olarak sol ventrikülün atım hacmini arttırma kapasitesini sınırlar ve böylece HKM’de görülen egzersiz intoleransı oluşumuna katkıda bulunur (47).

2.1.3.2. Miyokardiyal iskemi

Hipertrofik kardiyomiyopatide epikardiyal koroner arterlerde darlık olmadan da miyokardiyal iskemi görülebilir (48). İntramural arterlerin media tabakalarının kalınlaşması, anormal miyosellüler yapı, ciddi hipertrofi, intramural mikrodolaşımın bozulması yetersiz miyokardiyal kanlanmaya neden olur ve özellikle egzersiz esnasında miyokardın oksijen ihtiyacı arttığında bu durum daha da belirgin hale gelir (49-51). Diyastolik basıncın artmış olması koroner mikrodolaşımda basıya neden olur ve koroner kan akımın daha da azaltarak iskemiye artırır (52). Epikardiyal koronerler arterlerin normal olduğu halde görülen miyokardiyal iskemi de ölümcül aritmilere, sol ventrikül yeniden yapılanmasına (remodeling) ve sistolik disfonksiyona neden olur (53).

2.1.3.3. Sol Ventrikül Çıkış Yolu Obstrüksiyonu

HKM’li olgularının %70’inde istirahat veya fizyolojik uyarılarla (egzersiz vb.) değişen sol ventrikül çıkış yolunda (LVOT) tıkanıklık mevcuttur (54). Tıkanıklık, midventriküler veya apikal düzeyde görülebilse de en sık rastlanan formu mitral kapağın sistolik öne hareketine (SAM) bağlı olarak ortaya çıkan tıkanıklıktır (55). Mitral kapağın sistolde öne hareketi hakkında üç görüş ileri sürülmüştür:

- 1) Mitral kapak, anormal düzenlenmiş papiller kasların ve uzamış yaprakların kontraksiyonu ile LVOT’ a doğru çekilir (56)
- 2) Mitral kapak dışı akım yolundaki anormal pozisyonu nedeniyle septuma itilir
- 3) Daralmış olan sol ventrikül çıkış yolundan yüksek bir hızla atılan kanın oluşturduğu emme kuvveti nedeniyle mitral kapak septuma doğru çekilir (Venturi etkisi) (57).

SAM septuma ne kadar yakınsa ve temas süresi ne kadar uzunsa obstrüksiyonun derecesi o kadar fazladır (57). Bu etki genellikle mitral ön kapağın septuma değmesiyle oluşsa da olguların %5” inde arka kapağın öne hareketi gözlenir (58,59). Mitral kapaktaki SAM eşzamanlı olarak gerçekleşen ve yaprakçıkların yetersiz eşleşmesi sonucunda ortaya çıkan mitral yetersizliğinden de sorumludur. Oluşan mitral yetersizliği tipik olarak sol atriyumda arka duvara doğru yönelir ve hafif veya orta derecededir (60).

Gradiyentin ve çıkış yolundaki engelin nadir (%5 gibi) bir nedeni de (genellikle mitral-septal temasın olmaması halinde) kavitenin orta bölgesindeki, anterolateral papiller kasın anormal bir şekilde doğrudan ön mitral küspise yapışması, mid-ventriküler miyokard veya papiller kaskdaki aşırı hipertrofi ve yanlış dizilimdir (55,60). İstirahatte LVOT gradiyentin ≥ 30 mmHg olması HKM ile ilişkili ilerleyici kalp hastalığının ve kardiyovasküler ölümün belirleyicisi olarak saptanmıştır. LVOT'daki tıkanıklığın ani kardiyak ölümü öngördürücü özelliği belirgin kalp yetmezliği olmayan olgularda zayıftır (61). HKM LOVT gradiyentine göre hemodinamik alt gruplara ayrılabilir. Bu sınıflama, devamlı Doppler akımı ("continuous wave Doppler") ile belirlenen anlık zirve gradiyentine dayanılarak yapılabilir (62).

1. Obstrüktif HKM: İstirahat halinde gradiyentin >30 mmHg olması
 2. Latent HKM: İstirahat halinde gradiyentin < 30 mmHg, uyarılma ile > 30 mmHg olması
 3. Non-obstrüktif HKM: Gradiyentin istirahat ve uyarılabilir şartlarda < 30 mmHg olması
- HKM ilişkili semptomların tipik olarak egzersizle ortaya çıktığı düşünülürse latent gradiyentlerin ortaya çıkarılmasında egzersiz testinin kullanılması muhtemelen en fizyolojik ve tercih edilen provokatif manevradır (63).

2.1.3.4. Anormal Vasküler Yanıt

Normal olgularda kardiyak debi, egzersiz sırasında artar. Yüksek kalp hızında dolum süresi azalır ve sol ventrikül diyastol sonu hacim artışı olması için yüksek bir venöz dönüş ihtiyacı doğar. Bu ihtiyaç, egzersize katılmayan kapasitans yataklarındaki vazokonstriksiyonla karşılanır. Bu mekanizma özellikle yüksek kalp debisi gerektiren durumlarda ventrikülün yeterli dolumuna engel olan HKM ve diyastolik disfonksiyon varlığında daha da önemlidir (64,65). HKM'de bu mekanizma bozulmuştur. HKM'de uygunsuz vazodilatör yanıtın sebebi; miyozit düzensizliği ve fibrozis, arteriyel baroreseptörlerin artmış duyarlılığı ve artmış natriüretik peptide bağlı gelişen anormal duvar geriliminin ortaya çıkardığı aşırı uyarıma bağlanmıştır (65).

2.1.3.5. Aritmi

Supraventriküler taşiaritmiler HKM'de yaygındır (66). Atrial fibrilasyon (AF) en sık karşılaşılan uzamış aritmidir, görülme sıklığı yaşla birlikte artar ve sol atriyum (LA) büyümesi ile ilişkilidir (67). HKM'li hastaların büyük çoğunluğunda sık erken ventriküler vurular ve yaklaşık üçte birinde ise süresiz ventriküler taşikardi atakları holter EKG

tetiklerinde saptanabilir (68). Uzamış monomorfik ventriküler taşikardi nadirdir (66). Ventriküler taşikardi ileride gelişebilecek ani ölümün habercisidir (69).

2.1.4. Semptomlar

Hipertrofik kardiyomiyopatili hastaların çoğu asemptomatiktir (36). Korunmuş Sol Ventrikül fonksiyonları varlığında dispne, ortopne, paroksizmal dispne gibi kalp yetersizliği (KY) semptomları herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir (1). En sık rastlanan semptom dispnedir ve genelde yükselmiş sol ventrikül diyastolik basıncı sonucunda oluşur (38). Sol ventrikülün mikrovasküler dolaşım anormalliğine, oksijen gereksinimi ve sunumu arasındaki dengesizliğe ve bozulmuş diyastolik gevşeme nedeniyle gelişen subendokardiyal iskemiye bağlı göğüs ağrısı görülebilir (39). Hastaların bir kısmında aritmilere bağlı senkop, sersemlik ve çarpıntı gibi semptomlar olabilir (40). Senkobun paroksizmal aritmilere, ileti sistemi defektlerine ve egzersiz sırasında anormal vasküler cevaba bağlı olduğu düşünülmektedir (41,42). Ani ölüm ilk belirti olarak ortaya çıkabilir (43). Egzersiz genellikle semptomların şiddetinde artışa neden olur (44).

2.1.5.Genetik

Ailesel HKM, otozomal dominant geçiş gösterir. Hastalık kardiyak sarkomerlerin protein parçacıklarını kodlayan 10 genin herhangi birinde oluşan mutasyon sonucu ortaya çıkar. Mutasyonlar sarkomerlerin yapısal, kontraktıl ve düzenleyici fonksiyonlarından sorumlu herhangi bir bölgesinde ortaya çıkabilir (77-79). HKM'ye yol açan mutant genlerin en sık rastlanılanları beta-miyozin ağır zincir, miyozin bağlayan protein C ve kardiyak troponin T'dir. Daha az sıklıkla izlenenlerse; kardiyak troponin I, düzenleyici ve esansiyel miyozin hafif zincirleri, titin, α -tropomyozin, α -aktin ve α -miyozin ağır zinciridir (38,80,81). Bu mutasyonların büyük kısmı tek bir aminoasit değişimi ile oluşmaktadır (82-90). Sarkomer proteinleri tüm kas tiplerinde vardır. HKM'ye özgü mutasyonların kardiyak özgüllüğü, mutasyonların kalbe özgün izoformlarda görülüp bu izoformların iskelet ve düz kaslardaki sarkomerlerden farklı genlerde yer almasından kaynaklanmaktadır (91).

Gen mutasyonlarının fenotipik yansımaları sonucu klinik olarak hipertrofinin yaygınlık derecesi, gelişim süresi ve semptomatik özellikleri farklılık gösterebilir. *β miyozin ağır zincir defekti* en sık rastlanılan genetik mutasyon olup 14. kromozomda yer alır. Bu mutasyona sahip bireylerde hastalık fenotip olarak sık ifade edilir ve genelde erken tanı alırlar (92,93). İkinci en sık rastlanılan mutasyon 1. kromozomda bulunan *kardiyak troponin T* mutasyonudur ve daha yüksek ani kardiyak ölüm riski ile ilişkilendirilmiştir (94,95). Üçüncü

en sık rastlanılan mutasyon 11. kromozomda yer alan *miyozin bağlayan protein C* mutasyonu olup fenotipik yansıması daha azdır, daha ileri yaşlarda görülür ve prognoz diğer mutasyonlara göre daha iyidir (81,96). Sporadik formların spontan mutasyonlara bağlı olduğu düşünülmektedir. Hastalığın %50'sinden fazlasının genetik geçişli olduğu düşünülmektedir (97).

2.1.6. Klinik Gidiş

Klinik seyir değişkendir. Toplum kökenli çalışmalarda yıllık mortalite % 1'dir. 14 yaşın altında tanı alan ve HKM ile ilgilenen merkezlerde mortalite daha yüksektir (98). Hastaların büyük çoğunluğu uzun süre asemptomatik kalır (99,100). Ani ölüm, efor dispnesi, son dönem kalp yetersizliği, AF' ye bağlı komplikasyonlar hastalığın takibinde görülen komplikasyonlardır (67,98-101). Hastalığın prognozunda genetik bozukluk da önemlidir. Örneğin miyozin bağlayıcı protein C mutasyonları olanlarda hastalık genelde ileri yaşta çıkar ve prognoz selim seyreder (81).

2.1.7. Tanı

Hastalığın tanısı, myokart hipertrofisine yol açacak belirgin bir sebep olmaksızın (aort darlığı, hipertansiyon, atlet kalbi..) ortaya çıkan asimetric hipertrofinin varlığı ile konulur (62).

2.1.7.1. Fizik muayene

Özellikle LVOT'da tıkanıklığın görülmediği asemptomatik hastalarda, hafif hipertrofi veya apikal HKM'li olgularda fizik muayene normal olabilir ancak obstrüksiyon mevcutsa bulgular genellikle belirgindir (5). Apikal prekordiyal vuru güçlüdür ve sıklıkla laterale kaymıştır. Azalmış LV kompliyansına bağlı güçlü atriyal sistolden kaynaklanan bir presistolik apikal vuru alınabilir. Çift apikal impuls alınması hastalığın karakteristik özelliklerindendir (102). Daha karakteristik olan fakat daha seyrek gözlenen bir anormallik üçlü apikal vurumdur. Üçüncü impulsu, kalp hemen hemen tümüyle boşaldığında ve izometrik benzeri bir kontraksiyon gerçekleştirdiğinde ortaya çıkan geç sistolik vuru oluşturur (102). S1 normaldir ve öncesinde S4 duyulur. S2 genelde normal çiftleşir ancak şiddetli LVOT obstrüksiyonu olanlarda paradoksal çiftleşme görülebilir (102). Sol ventrikül çıkış yolu obstrüksiyonu olanlarda tipik olarak gürültülü ve kreşendo-dekreşendo tarzında sistolik üfürüm duyulur. Bu ses genellikle S1'den hemen sonra ve en iyi apeks ile sol sternum sınırı arasında duyulur (102). Yüksek gradiyenti olan hastalarda üfürüm genellikle hem LVOT türbülansını hem de eşlik eden mitral yetersizliğini (MY) yansıtır (103).

2.1.7.2. Elektrokardiyogram

HKM hastalarında %75-85 EKG normal değildir (104). Sol ventrikül hipertrofisi (LVH) sınırlı bir bölgede olan hastalarda EKG normaldir. En sık karşılaşılan bulgular, ST segmenti ve T dalgası anormallikleridir. Midprekordiyal derivasyonlarda en uzun boyuta ulaşan QRS kompleksleri ile birlikte LVH bulguları görülebilir ancak HKM özgül değildir (104). Uzak doğu ülkelerinde daha sık görülen apikal HKM'de prekordiyal derivasyonlarda dev negatif T dalgaları tipiktir, fakat aynı bulgular apikal bölge dışındaki tutulumlarda da görülebilir (105). Patolojik Q dalgaları hastaların %20-50'sinde, özellikle inferior (II, III, aVF) ve prekordiyal (V2-V6) derivasyonlarda izlenebilir (106).

2.1.7.3. Ekokardiyografi

Hipertrofik kardiyomiyopatinin klinik tanısı günlük pratikte en sık transtorasik ekokardiyografi (EKO) ile konulmaktadır. Tanı için kullanılan ekokardiyografik kriter genellikle maksimum duvar kalınlığının ≥ 15 mm olmasıdır (5). Ekokardiyografi ile LV hacimleri ve hipertrofinin tipi rahatlıkla belirlenebilir. Ventriküler hacimler HKM'de sıklıkla normal veya hafif azalmış olarak saptanır (108). Hipertrofiye olmuş duvarların sıklıkla diğer duvarlara göre biraz daha parlak olduğu, hipertrofinin ise sıklıkla asimetrik bazen de konsantrik tipte olduğu görülür (108). Hipertrofi septumda daha sık görülse de LV'nin herhangi bir duvarında da olabilir. Hipertrofinin ciddiyetinin ve yerinin lokalizasyonunda zorluk sol ventrikül içine kontrast ajanlar verilerek değerlendirilebilir (109). Apikal HKM kontrast ajanlar kullanılmadığı zamanlarda gözden kaçırılabilir (110). Üç boyutlu (3B) EKO, LV kitlesinin değerlendirilmesinde en iyi ekokardiyografik yöntemdir (108).

Hipertrofik kardiyomiyopatide ejeksiyon fraksiyonu (EF) genelde normal veya artmıştır (108). Hastalığın ilerleyen dönemlerinde LV sistolik disfonksiyonu saptanır. İki boyutlu (2B) ve 3B görüntülemeye ek olarak Doppler EKO metodu ile de subklinik LV sistolik disfonksiyonunun varlığı belirlenebilir. Doku Doppler görüntüleme (DDG) ile sistol ve diyastol esnasındaki miyokardiyal hareketin hızları ölçülebilir (44). Miyokardiyal "strain ve strain rate" sistolik fonksiyonlarının değerlendirilmesinde ve non-obstrüktif HKM ile hipertansif LVH'nin ayrımında kullanılabilir (111).

HKM hastalarında ekokardiyografi sırasında diyastolik anormallikler de değerlendirilmelidir. Mitral içe akım ve pulmoner venöz akım dalgaları ile LV diyastolik fonksiyonu invaziv parametreleri arasında zayıf ilişki saptanmış olsa da, pulmoner venöz akımın tersine atriyal hızının ve mitral içe akımın erken diyastolik dalga hızının (E hızı) doku

Doppler ile elde edilen erken miyokardiyal hıza (E') oranının LV diyastol sonu basıncı ile anlamlı ilişki gösterdiği saptanmıştır (107,112). Sol atriyum boyutları genelde artmıştır fakat LA boyutları konusunda daha iyi bir bilgi yansıttığından LA hacim indeksini değerlendirmek daha doğru bir yaklaşımdır (113). Mitral kapağın yapısal anormallikleri HKM'li olguların yaklaşık 2/3'ünde izlenmiştir. Mitral yaprakçıkların uzamasına veya ön yaprakçığın ya da arka yaprakçığın orta bölümünün segmental genişlemesine bağlı mitral kapak boyutlarında 2 kat kadar artış görülebilir (114). Mitral yetersizliğinin derecesi ön ve arka kapak arasındaki uzunluk farkı ve arka kapağın öne doğru hareket etme kabiliyetiyle ilişkilidir (115). Dinamik obstrüksiyon da MY'nin ciddiyetini etkiler. Bu nedenle HKM'de MY dinamiktir ve obstrüksiyonun şiddetini etkileyen faktörlerden etkilenir (103). Ancak HKM ile ilişkili tüm MY akımları SAM nedeniyle oluşmaz. Bu hastalarda mitral kapak prolapsusu, tekrarlayan septal temas veya türbülans jet nedeniyle oluşan hasara bağlı kapak kalınlaşması, korda rüptürü, korda uzaması ve kalınlaşması gibi intrinsik kapak patolojileri de görülür (103). Mitral yetersizlik akımının merkezi olduğu veya öne doğru yöneldiğinin görüldüğü durumlarda mitral kapağın kendisinden kaynaklanan patolojilerinin saptanması amacıyla transözefajiyal ekokardiyografi (TÖE) yapılmalıdır (108).

HKM hastalarında tıkanıklık sadece LVOT'de değil özellikle papiller kasların hipertrofisine bağlı olarak midventriküler bölgede de görülebilir. Midkaviter tıkanıklığın varlığı ve lokalizasyonu noktasal Doppler ile taranmalıdır (108). Sabit LVOT'ta tıkanıklık yapabilecek subvalvüler membran da ayırıcı tanıda düşünülmeli ve LVOT anatomisi dikkatli değerlendirilmelidir (108).

2.1.7.4. Nükleer görüntüleme

Radyonüklid anjiyografi veya "single photon-emission computed tomography (SPECT)" ile LV hacimleri ve EF ölçülebilir. Kalınlaşmış miyokart bu tekniklerle görüntülenebilir. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve EKO' ya göre daha düşük çözünürlüğe sahiptir. Miyokardiyal iskeminin varlığı ve yaygınlığı bölgesel talyum alımı SPECT tekniği ile değerlendirilebilir ancak iskemi olmayan hipertrofinin belirgin olduğu bölgelerdeki artmış radyoaktif izotop alımı nedeniyle diğer bölgelere göre düşük alım saptanmasına bağlı yanlış pozitif sonuçlar görülebilir (116,117). Göğüs ağrısı olup koroner arter hastalığı (KAH) olasılığı düşük olan hastalarda stres SPECT görüntüleme düşünülebilir (108).

Pozitron emisyon tomografi (PET), SPECT'ten farklı olarak doku gramı başına düşen miyokardiyal kan akımını mililitre olarak gösterir. Pahalı bir yöntem olması dezavantajıdır. Özellikle vazodilatasyon sırasında HKM hastalarında miyokardiyal kan akımındaki artışta bozulma olduğu ve bunun prognostik öneme sahip olduğu gösterilmiştir (118). KY veya anjinası olan seçilmiş hastalarda EF değerinden bağımsız olarak PET ile değerlendirme yapılabilir (108). SPECT ve PET tetkikleri HKM hastaların rutin olarak önerilmemektedir (108).

2.1.7.5. Manyetik Rezonans Görüntüleme

MRG ile duvar kalınlıkları, LV hacimleri, hipertrofinin lokalizasyonu ve ciddiyeti hakkında değerlendirme yapılabilir (119). HKM hastaların %10'unda hipertrofi LV segmentlerinden sadece bir veya iki segmentte görülür ki bunlarda hipertrofinin lokalizasyonu ve ciddiyetini değerlendirmede MRG kullanılabilir (119). Genelde maksimum duvar kalınlıkları EKO ile ölçülen değerlere benzer fakat lokal bölgelerdeki artmış duvar kalınlıkları 2 boyutlu ekokardiyografi ile görüntülenemeyebilir, bunlar ancak MRG ile saptanabilir. LV'nin bazal anterolateral serbest duvarı ve apeks kardiyak MRG ile EKO'ya göre daha iyi görüntülenir (120). Hipertrofik kardiyomiyopati olguların üçte birinde sağ ventrikül duvar kalınlığının ve kitlesinin artmış olduğu kardiyak MRG ile görüntülenmiştir (121). Yine HKM'li hastalarda artmış papiller kas sayısı ve kitlesi MRG ile saptanabilir (122). Mitral kapak ve MY'nin mekanizması, ciddiyeti ve papiller kasların lokalizasyonu MRG ile değerlendirilebilir ve bu durum özellikle cerrahi tedavi planlanan hastalarda önemlidir. Gadolinyumlu kardiyak MRG ile istirahat ve stres sırasındaki miyokardiyal kan akımı değerlendirilir (123). Vazodilatör ajanlarla yapılan farmakolojik stres MRG ile iskemi araştırılmasının şu an için rutin olarak her hastada yapılması önerilmemektedir (108). Fibrotik miyokardiyal sahalar da kardiyak MRG ile görüntülenebilir (124).

2.1.7.6. Bilgisayarlı Tomografi

Kardiyak anatomi, mitral kapak, papiller kaslar, koroner arterler, miyokardiyal kas yapısını ventrikül hacimlerini ve bölgesel duvar fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılabilir (125,126).

2.1.7.7. Genetik Test

Ailesel HKM otozomal dominant geçiş gösterir. HKM'nin kesin tanısı mutant genlerin DNA analizi ile tanınması ile konulur. Miyokardiyal duvar kalınlıkları normal sınırlarda olsa da genetik testin pozitif olması HKM tanısı koydurur (33,78).

2.1.7.8. Kardiyak Kateterizasyon ve Biyopsi

Ekokardiyografik teknikler ve diğer non-invaziv yöntemler tanı için yeterli olduğundan genellikle kardiyak kateterizasyona gerek duyulmaz. Eşlik eden KAH varlığında ya da perkütan septal ablasyon gibi invazif tedavi yöntemleri seçilecekse kardiyak kateterizasyon yapılabilir. Sol ventrikül çıkış yolu obstrüksiyonu olan hastalarda LVOT'dan aort kapağına doğru basınç ölçümleriyle basınç gradiyenti saptanabilir. Basınç gradiyentinin değişken ve kararsız olması hastalığın karakteristik özelliğidir. Pulmoner kapiller kama basıncı (PCWP) ve LV diyastol sonu basıncı, LVOT'da gradiyent olsun olmasın yüksektir. Sağ ventrikül çıkış yolu gradiyenti olmadığı ve restriktif patern izlenmediği sürece sağ ventrikül ve sağ atriyum basınçları normaldir. Apikal HKM'de ventrikülografide 'maça' görüntüsü tipiktir (127). Hipertrofik kardiyomiyopatide koroner anjiyografi de nadir olarak epikardial damarların sistolik obliterasyonuna neden olan 'miyokardiyal kas köprüsü' izlenir.

Kardiyak biyopsi daha çok HKM'yi taklit eden amiloidoz gibi infiltratif hastalıkların ekarte edilmesi için yapılabilir ancak rutin olarak önerilmemektedir. Mikroskopik olarak miyozit hipertrofisine ait değişiklikler izlenir, fakat en tipik bulgu hipertrofik miyofibrillerin paralel demetler yerine gelişmiş güzel dağılım göstermeleridir. Hipertrofik kardiyomiyopatiden ölen hastaların neredeyse tamamında >%5 miyofibriller dizilim bozukluğu, yaklaşık %50'sinde intramural koroner arter duvarında kalınlaşma ve lümeninde daralma bulunmuştur (128).

2.1.8. Tedavi

HKM tedavisinde amaç semptomları azaltmak, komplikasyonları önlemek ve ölüm riskini azaltmaktır. Obstrüksiyonu olmayan hastalarda, kalsiyum antagonistleri (verapamil) ve beta blokerler (metoprolol, atenolol) kullanılmaktadır (129,130). Sadece egzersiz sırasında çıkış yolu gradiyenti olan semptomatik hastaların tedavi yaklaşımında beta blokerler tercih edilen ilaçlardır (62). İstirahatte obstrüksiyonu bulunan, fonksiyonel kapasitesi belirgin olarak kısıtlı hastalarda disopiramid (grup IA antiaritmik) semptomatik fayda sağlar (131), ancak yan etki profili ve proaritmik etkisi nedeniyle daha çok beta blokerlere veya verapamile cevapsız çıkış yolu obstrüksiyonlu hastalarda kullanılmaktadır (62). Obstrüksiyonu azalmak için medikal tedaviye dirençli hastalarda DDD pacemaker uygulaması yapılmıştır (132), ancak şuan için sınırlı bir grup hastada uygulanmaktadır. Losartan, statinler, spirinolakton gibi ilaçlar HKM'li hastalarda denenmiş olan medikal tedavi seçeneklerindendir (133,134). Obstrüksiyonu mekanik olarak azalmak için perkütan septal alkol ablasyonu ve cerrahi

miyektomi tedavi seçenekleri arasındadır (135,136). Obstrüktif HKM'li hastalarda son zamanlarda LVOT gradiyentinin azaltılması amacıyla biventriküler pacing uygulaması gündeme gelmiştir (137). Ani kardiyak ölümün önlenmesi amacıyla primer ve sekonder koruma amacıyla implante edilebilen kardiyoverter defibrilatörler kullanılmaktadır (138).

2.2.Mikro-RNA

MikroRNA'lar 18-25 nükleotid uzunluğunda, gen üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgelerinin yanısıra protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden kopyalanan ancak proteine sentezi gerçekleşmeyen (kodlanmayan) RNA molekülleridir (139,140).

İlk olarak mikroRNA, 1993'te Lee ve arkadaşları tarafından Victor Ambors laboratuvarında keşfedilmiştir. 2001 yılından mikroRNA ismi kullanılmaya başlanmıştır (141,142). 1993 yılında Lee ve arkadaşları bir nematod (solucan) olan *Caenorhabditis elegans*'ın gen içeriğini incelemiş ve lin-4 adı verdikleri bir genin, protein kodlamamasına rağmen 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini tespit etmişlerdir (139-142). Reinhart ve arkadaşları 2000 yılında *C.elegans*'da let-7 adını verdikleri, canlıda gelişimi düzenleyen başka bir mikroRNA keşfettiler (143). Daha sonra Let-7'nin insanlar içinde önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu gösterilmiştir (144). İlerleyen yıllarda let-4 ve let-7'ye benzeyen çok sayıda küçük RNA tespit edilmiş ve mikroRNA olarak adlandırılmaya başlanmıştır (145).

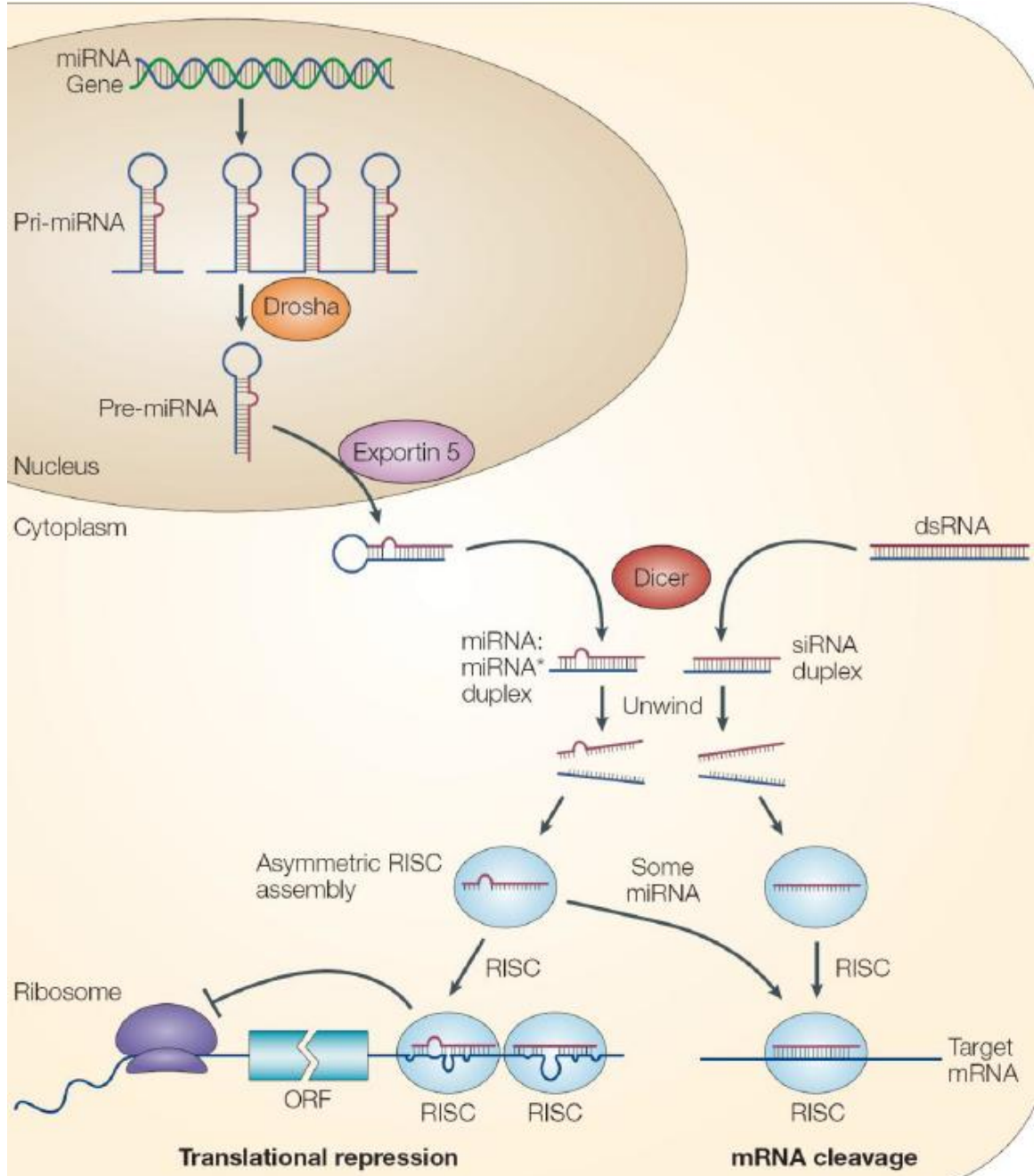
2.2.1.MikroRNA'ların Oluşumu

MikroRNA sentezi üç aşamada gerçekleşir. İlk olarak miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA) transkripsiyonu meydana gelir. Daha sonra hücre nükleusu içinde primiRNA, prekürsör miRNA (pre-miRNA)'ya dönüşür. Son olarak pre-miRNA'nın stoplazmaya taşınması ile olgun miRNA oluşumu tamamlanır (140-146).

MikroRNA genomik DNA'dan RNA Polimerz II enzim aracılığıyla primer transkript (pri-miRNA) olarak sentezlenir. Pri-miRNA sap-ilmik yapısında cap ve poli A kuyruğuna sahip olup 500-3000 baz uzunluğundadır. Hücre çekirdeğinde bir endoknükleaz olan Drosha ve Pasha kofaktörü (DGCR8) tarafından pri-miRNA, pre-miRNA'ya dönüşür. Pre-miRNA 70 nükleotid uzunluğundadır (147). Drosha ve Pasha (çift iplikli RNA bağlayıcı protein) birlikte mikroişlemci kompleks (Microprocessor complex) oluşturur (148).

Pre-miRNA molekülü Exportin 5 ve nüklear bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır. Stoplazmada bulunan Dicer (RNAaz III) adlı endoknükleaz pre-

miRNA'yı keserek çift zincirli 18-25 nükleotid uzunluğundaki miRNA dubleks oluşturur (149,150). Bir endonükleaz olan Dicer ayrıca RNA indükleyici susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. Dicer, pre-miRNA'ı kestikten sonra, miRNA dubleksinden birisi RISC kompleksine katılır. Argonaute adlı bir RNAaz (RISC kompleksinin içinde) miRNA dubleksinden 5 ucu daha kararlı olan ipliği seçerek komplekse dahil eder. RISC kompleksine dahil olan kılavuz iplik (guide strand), dahil olmayan iplik ise anti-kılavuz iplik adını alır ve RISC kompleksi tarafından substrat olarak kullanılır. Böylece RISC yapısına katılan miRNA'lar mRNA yıkımına sebep olur ya da protein translasyonunu engeller (149-152). (Şekil 1) (139).

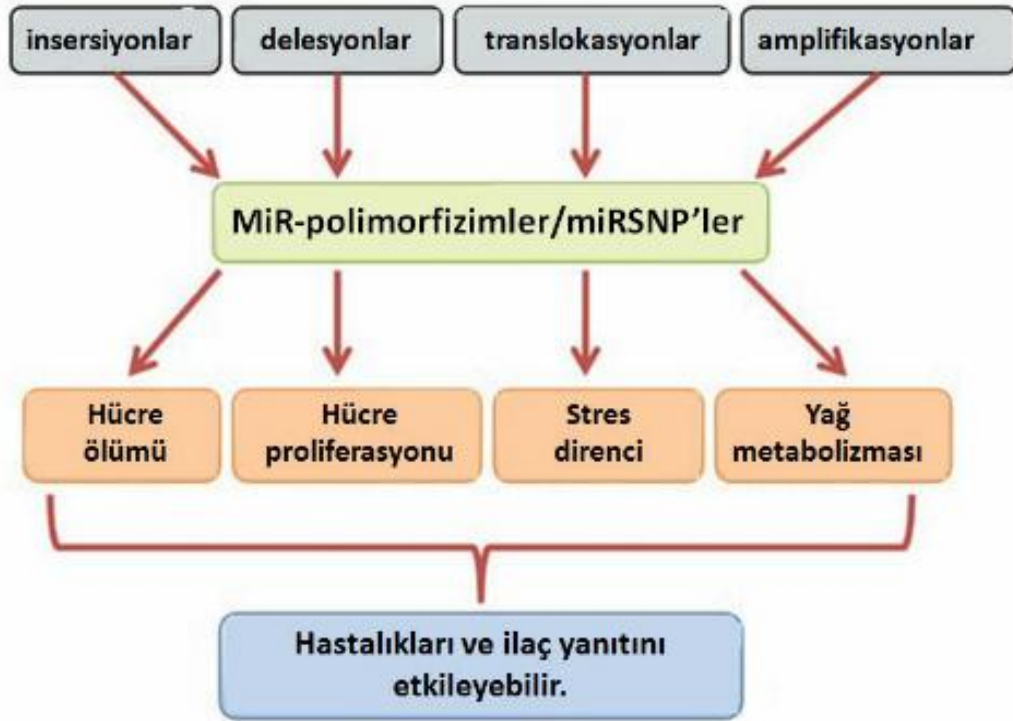


Şekil 1: miRNA Sentezi

2.2.2. MikroRNA'ların Fonksiyonu

MikroRNA'lar genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezini düzenler. Bir nevi genin işlevlerinin engellenmesine sebep olurlar. MikroRNA'lar kendi nükleotid dizilerinde tamamlayıcı hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. MikroRNA RISC kompleksine bağlandığında, baz çiftleşme özelliği sayesinde messenger RNA (mRNA) bağlanır böylece mRNA'nın yıkımına ya da protein sentezinin inhibisyonuna yol açar (139,140).

miRNA ya mRNA'nin 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye (*untranslated region-UTR*) ya da mRNA'nın *ORF* (*open reading frame*) adı verilen bölgesine bağlanır (152). Bağlanma pozisyonu mikroRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlıdır. 3' UTR bölgesine bağlanma tam olmayan, eksik bağlanmayı içerir ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. *ORF* bölgesi içine bağlanma ise eksiksiz, tam komplementerlik gösterir ve *Argonaute2(Ago2)* tarafından mRNA'nın yıkımına yol açar. mikroRNA'lar birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği gibi mRNA'lar da birden fazla mikroRNA tarafından hedef seçilebilirler (153,154). miRNA'ların hücre üzerindeki etkileri şekil 2'de gösterilmiştir (152).



Şekil 2: miRNA'nın Etkilediği Basamaklar

2.2.3.Mikro-RNA ve Kalp

Kalbin gelişiminde ve patolojisinde birçok karmaşık genetik mekanizmalar rol oynar. MikroRNA'lar kardiyak gen ifadesini protein sentez aşamasında etkilemektedir. Farelerde yapılan çalışmalar kalbin gelişiminde mikroRNA'ların çok önemli rolleri olduğunu göstermiştir. Chen ve arkadaşları farelerde kalp dokusunda bütün mikroRNA'ların üretimi için gerekli olan bir endonükleazı (*dicer*) yıkıma uğratmışlar ve farelerde ciddi DKMP'li ve

kalp yetmezliğine bağlı ölüm gözlemişlerdir (156). Liu ve arkadaşları farelerde yaptıkları çalışmada miR-133a eksikliğinin DKMP'ye yol açtığını göstermişlerdir (157). Zhao ve arkadaşlarının farelerde yaptıkları diğer bir çalışma ise kas spesifik miRNA'ların (mir-1-2) kalpte sinyal iletimi, kardiyak morfogenez ve hücre siklusunda önemli rolleri olduğunu göstermiştir (158). İnsanlarda yapılan miRNA profillemeye çalışmalarında hastalıklı kalplerde kardiyomyopatilerle ilişkili olan belirli miRNA ekspresyonlarında değişiklikler tespit edilmiştir (159). Bir diğer çalışmada miRNA'ların kalbin gelişiminde ve patolojik durumlarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (160). Yapılan başka bir hayvan çalışmasında da miR-208'in kardiyak hipertrofiyle ilgili olduğu gösterilmiştir (161). Kalbin anatomik gelişimiyle ilgili olarak da miR-138'in önemli olduğu tespit edilmiştir (162). Akut myokard enfarktüsü geçiren hastalarda yapılan bir çalışmada miR-208 ve miR-499'un kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir (163,164). Yine benzer şekilde akut miyokard enfarktüsü geçiren hastalarda yapılan başka bir çalışmada miR-1 anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (165). Duisters ve çalışma arkadaşları; patolojik sol ventrikül hipertrofisinde cTGF ekspresyonu ve fibrozisin regülasyonunda miRNA ların temel bir fonksiyonu olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar iki major kardiyak miRNA olan miR-30 ve miR-133'ün kalp hastalığı süresince down-regüle olduğunu ve bu iki miRNA nın baskılanmasının cTGF'nin ekspresyon artışı, kollajen üretimi ve fibrozis ile ters ilişkili olduğunu göstermişlerdir (166). Başka bir çalışmada; fibroblastlarda yüksek oranda bulunan miR-29 ailesinin fibroziste bulunan çok sayıda ekstraselüler matrix ile ilişkili proteinleri (multiple kollajen, fibrilin ve elastini içeren) kodlayan mRNA'ları hedef aldığı gösterilmiştir. Miyokard enfarktüsüne cevapta, miR-29 ailesi üyeleri infarkta komşu olan bölgelerde down-regüle olmaktadır. miR-29'un down regülasyonu ile baskılanan bu mRNA'ların ekspresyonu tekrar aktive olmaktadır ve bu yolla fibrotik cevap artmaktadır (18). Çeşitli kardiyak stres formlarına cevapta miR-21, miRNA'lar arasında en güçlü up-regüle olan miRNA'dır (18,159). Yakın zamanda, Thum ve arkadaşları kalp yetmezliğinde kardiyak fibroblastlarda miR-21'in up-regüle olduğunu ve burada miR-21'in, ERK-MAP kinaz sinyal yolağının negatif bir düzenleyicisi olan Sprouty homolog 1'in (Spry 1) baskıladığını göstermişlerdir. Kardiyak hasara cevap olarak miR-21'in upregülasyonu ile ERK-MAP kinaz sinyalizasyonunda artış görülmektedir ve bu da fibroblast proliferasyonuna ve fibrozise yol açmaktadır (167). Fareler üzerinde yapılan başka bir diğer araştırmada aortik bantlama yöntemi ile farelerde kalp hipertrofiye hale getirilerek kontrol grubu ile karşılaştırılmış, daha sonra Microarray analizinden elde edilen sonuçlarda miR-21, -

27a, -27b, -146, -214, -341, ve -424 yüksek oranda up-regüle olduğu, buna karşın miR-29a, -29b, -29c, -30e, -126-5p, -133a, -133b, -149, -150, -185, -451, ve -486'nın ise önemli ölçüde down-regüle olduğu tespit edilmiştir. Dikkat çekici bir şekilde hipertrofik kalpte miR-21 kontroller ile karşılaştırıldığında 4 kattan fazla artış göstermiştir (22). Ratlarda yapılan başka bir çalışmada miR-23a, 27, 125b ve 195'nin kardiyak hipertrofi ile ilişkili olduğu (upregülasyon) saptanmıştır (168). Olson ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada miR-21, 23a, 23b, 24, 27a, 27b, 125b, 195, 199a, 214 ve 217'nin transgenetik kalsinörin ve aortik daraltma yöntemi ile kardiyak hipertrofi yapılmış ratlarda upregüle olduğu, buna karşın miR-29c, 93, 133a, 150, 181b'nin down regüle olduğu gözlenmiştir. (159). Sayed ve arkadaşları kardiyak hipertrofisi gelişimi sırasında ekspresyonda değişiklik gösteren 50'den fazla miRNA saptamış ve hipertrofi esnasında down regüle olan ilk mikroRNA arasında miR-1'i tespit etmişlerdir (21). Hem miR1 hem de miR133'ün büyüme ile ilişkili genlerin ekspresyonunu regüle ettiği öne sürülmektedir. Sucharov ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada miR1 ve miR133'ün kardiyomiyozit apoptozisinde ayrı bir rolü olduğu öne sürülmüştür. miR1 proapoptotik iken miR133 antiapoptotik gibi görünmektedir (169). Başka bir çalışma miR133b down regülasyonunun hipertrofik gen ekspresyonunu uyarmak için yeterli olduğunu, miR133b'nin aşırı ekspresyonunun gen ekspresyonunda b-AR aracılı değişiklikleri hafiflettiğini göstermiştir. Bu çalışmalar miR133 ve miR1'in kardiyak hipertrofinin düzenlenmesinde anahtar rolü olduğunu göstermiştir.

2.2.4. Serum ve mikro RNA

Son çalışmalarda dolaşımda kodlama yapan ve yapmayan plasental mikroRNA gibi RNA parçacıkları tespit edilmiştir (170). 2008 yılında Lawrie ve arkadaşları (171) tarafından yapılan bir çalışmada mikroRNA'lar B hücreli bir lenfoma için yeni bir biyomarker olarak tanıtılmıştır. Chen ve arkadaşları (172) küçük hücre dışı akciğer kanseri, kolorektal kanser ve tip 2 diyabetli hastaların serum mikroRNA profillerinin sağlıklı insanlarınkilerden anlamlı farklılıklar gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sepsis ile ilgili olarak Wang JF ve arkadaşları (173), çalışmalarında inflamasyonla ilgili olduğu tespit edilen yedi miRNA'yı serumda çalışmış ve miR-146a ve miR-223 düzeylerinin sepsiste anlamlı olarak düşük olduğunu saptamışlardır. Başka bir çalışma da D'Alessandra ve arkadaşları (174) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada da kas dokusunda çok bulunduğu tespit edilen miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499-5p gibi mikroRNA'ların plazma seviyelerinin akut miyokard enfarktüsü olan insanlarda ve deneysel fare modellerinde arttığını tespit etmişlerdir. Fukushima ve arkadaşları

(175) iskemik kalp hastalığına bağlı kalp yetmezliği bulunan hastalarda yaptıkları bir çalışmada plazma miR-126 seviyesiyle kalp yetmezliği sınıfı arasında negatif korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. MikroRNA'ların dolaşıma nasıl salındıkları bilinmemektedir. Bununla beraber fiziksel koşullara çok dayanıklı oldukları ve RNaz aktivitesinden etkilenmedikleri saptanmıştır (176,177). Bu özelliklerin nasıl sağlandığı yönündeki çalışmalar ise mikroRNA'ların dolaşıma mikroveziküller içinde veya ekzozomlar şeklinde salındığı yönünde fikirler vermiştir (178,179). Ayrıca dolaşımdaki mikroRNA'ların birer sitokin gibi taşınıp biyolojik fonksiyonları olabileceğine dair hipotezler de mevcuttur (180). Bununla birlikte yakın zamanda yapılan bir çalışmada dolaşımdaki mikroRNA'ların küçük bir kısmının veziküller içinde taşındığı, büyük bir kısmının ise Argonaute 2'yle ilişkili olarak taşındığı bulunmuştur. Argonaute 2 ise RNA-induced silencing complex (RISC)'in etkin bileşeni olup miRNA'ları direkt olarak bağlar ve hücrelerde messenger RNA baskılanmasını gerçekleştirir (181).

3. MATERYAL VE METOD

3.1.Çalışma Grupları

Bu çalışmamızda Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp fakültesi Kardiyoloji Ana Bilim Dalı polikliniğine mart 2012 ve mart 2013 tarihleri arasında başvuran klinik ve ekokardiyografik olarak Hipertrofik Kardiyomiyopati ve hipertansif sol ventrikül hipertrofisi tanısı alan hastaların alınması planlandı. Vakalar toplam 3 gruba ayrıldı. 1.grupta hipertrofik kardiyomiyopatili hastalar, 2.grupta hipertansiyona bağlı sol ventrikül hipertrofisi bulunan hastalar, 3. grupta ise kontrol hastaları alındı. HKM grubunda 26, hipertansif grubunda 25 ve kontrol grubunda 24 olmak üzere toplam 76 hasta çalışmaya dahil edildi. HKM tanı kriteri olarak 2 boyutlu ekokardiyografi ile sol ventrikül hipertrofisi yapabilecek hipertansiyon, aort darlığı, subvalvüler membran ve sistemik hastalık gibi bir patoloji dışlandıktan sonra hipertrofik (duvar kalınlığı ≥ 15 mm) olan ancak dilate olmayan sol ventrikül varlığının saptanması kistas alındı. İnterventriküler septumun duvar kalınlığının posterior duvar kalınlığına oranı $\geq 1,3$ olması asimetrik septal hipertrofi olarak değerlendirildi (5,62,182,183,184). İstirahatte devamlı (CW) Doppler ekokardiyografi ile LVOT gradiyentinin ≥ 30 mmHg olması obstrüktif HKM olarak kabul edildi (62,183). Yine hipertansiyona bağlı sol ventrikül tanısı için hastanın öyküsünde hipertansiyon olması, septum ve/veya arka duvar kalınlığının $\geq 1,1$ cm olması şeklinde belirlendi (184). Kalp yetmezliği, ileri kapak hastalığı kalbin büyüten nedenler ile kardiyovasküler cerrahi (CABG, kapak cerrahi..), tümör öyküsü, kronik romatolojik hastalığı olanlar ve ileri yaş hastalar çalışmaya alınmadı. Vakaların yaş aralığı 20-65 olarak belirlendi. Çalışmaya alınan bütün vakalarda yazılı bilgilendirilmiş onam formu imzalatıldı. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruldan 17/04/2012 tarihinde 2012/51 protokol ve 11 nolu karar ile çalışma için onay alındı.

3.2. Ekokardiyografik Çalışma

Ekokardiyografik değerlendirme, Hewlett Packard Sonos 5500 cihazıyla (2.5 mHz prob) Amerikan Kardiyoloji Derneği ve Avrupa Kardiyoloji Derneği Kalp Boşlukları Ölçüm Kılavuzu'na uygun olarak yapıldı (113). Ölçümler, sol yan pozisyonda parasternal uzun ve kısa eksen ile apikal iki ve dört boşluk görüntülerden elde edildi. Sol ventrikül sistolik fonksiyonları: Sol ventrikül sistolik fonksiyonları, fraksiyonel kısalma ve ejeksiyon fraksiyon

modifiye “Simpson” metodu ve ile değerlendirildi (185). Modifiye simpson yöntemi ile apikal 4 ve 2 boşluk görüntüde sistol ve diyastolde sonu endokardiyal sınır tespit edilerek sistol ve diyastol sonu hacimlerden ejeksiyon fraksiyon hesaplandı. Kapak fonksiyonları ekokardiyografik inceleme sırasında tüm kapaklar yetersizlik veya darlık varlığı açısından devamlı Doppler ve renkli Doppler inceleme ile değerlendirildi. Sol ventrikül hipertrofisi tanısı interventriküler septum, arka duvar kalınlıkları ve sol ventrikül kitle indeksi hesaplanarak konuldu. Sol ventrikül kitlesi Devereux formülüne göre $(0.8 \times 1.04 \times ((LV_{ed} + pw + ivs)^3 - (LV_{ed})^3) + 0.6)$ hesaplandı ve bu değer vücut yüzey alanına bölünerek sol ventrikül kitle indeksi hesaplandı. Sol ventrikül kitle indeksi kadınlarda $>100 \text{ gr/m}^2$, erkeklerde $>125 \text{ gr/m}^2$ olması sol ventrikül hipertrofisi olarak kabul edildi (186).

Sistolik öne hareketin varlığı; 2 boyutlu ekokardiyografi ile transtorasik parasternal uzun aks ve apikal 4 boşluk kesitlerinde değerlendirildi. SAM M-mod ekokardiyografi ile mitral kapağın interventriküler septuma doğru hareketi değerlendirilerek doğrulandı (57,187). LVOT gradiyenti, sol ventrikül çıkış yoluna devamlı Doppler konularak değerlendirildi. Zirve ve ortalama basınç gradiyentleri kaydedildi.

3.3. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Çalışmaya alınan her hastanın periferik veninden elde edilen 3 cc kan miRNA'ya özel EDTA'le stabilize tüplere alındı. Hem kontrol hem de çalışma gruplarındaki hastaların çalışma için alınan kan örneklerinden elde edilen plazma çalışma yapılmaya kadar -80 C derecede saklandı.

3.4. Örneklerin Çalışılması

3.4.1. RNA izolasyonu

Küçük RNA'ları (örn. miRNA) da içeren total RNA izolasyonu için, 18 nükleotidin üzerindeki bütün RNA'ları saflaştırabilen miRNeasy Kiti (Qiagen) kullanıldı. Bu Kit fenol/guanidinin tiyosiyanat'dan oluşan monofazik bir solüsyon (QIAzol Lysis Reagent) ile hücrelerin parçalanmasına ve total RNA'nın silikamembran kolonla saflaştırılması temeline dayanmaktadır.

- Kan örnekleri 14000 RPM'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılır ve 10ml su ile pellet süspanse edildi.
- Süspansiyon 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılır ve 700 µl QIAzol Lysis Reagent eklendi.

- Pellet mikrosantrifüj(ependorf) tüp içerisine alınarak vorteksle veya pipetaj ile görünür hiçbir pelet yığını kalmayınca kadar karıştırıldı.
- Mikrosantrifüj tüp içerisindeki homojenatlar 5 dk. oda sıcaklığında (15–25°C) inkübe edildi. Üstlerine 140 µl kloroform eklenerek bir sonraki aşamadaki faz ayrımı için 15 sn. kuvvetlice çalkalandı.
- Homojenatların bulunduğu tüpler oda sıcaklığında (15–25°C) tezgah üstünde 2-3 dakika tekrar inkübe edildi. Daha sonra 4°C’de 15 dakika 12,000 x g hızda santrifüj edilerek örneklerin 3 faza ayrışması sağlandı: üstte RNA içeren renksiz sulu faz (hacmi yaklaşık 350 µl); ortada beyaz ara katman (interfaz), ve altta kırmızı organik faz.
- Sulu faz yeni bir toplama tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine hacminin 1,5 katı kadar %100’lük etanol (~525 µl) eklendi ve pipetaj ile tamamen karıştırıldı.
- Örnek karışım (yaklaşık 700 µl), oluşabilecek herhangi bir çökelti de dahil olacak şekilde kit içeriğindeki 2ml’lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy Mini spin kolonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında (15–25°C) $\geq 8000 \times g$ 15 sn. santrifüjlendi. Elüsyon döküldükten sonra filtre aynı toplama tüpüne yerleştirilerek ve kalan karışım tekrar filtrelerin üzerine eklenip tekrar oda sıcaklığında , $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) ‘de 15 sn. santrifüjlendi.
- Elüsyon atılarak aynı toplama tüpüne yerleştirilen kolon üzerine 700µl Buffer RWT tamponu eklendikten sonra 15 sn $\geq 8000 \times g$ ‘de ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edildi.
- Kolon üzerine 500 µl Buffer RPE yıkama tampon eklendikten sonra 15 sn $\geq 8000 \times g$ ‘de ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edilerek yıkandı. Elüsyon atılırken kolon aynı toplama tüpüne yerleştirildikten sonra yıkama işlemi aynı şekilde 500 µl Buffer RPE yıkama tampon ile aynı hızda 2 dk. santrifüj edilerek tekrarlandı.
- Elüsyon atılırken kolon elüsyonla temas etmeyecek şekilde yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Herhangi bir yıkama tampon veya elüsyon artığını elimine etmek için yeni toplama tüpü içine yerleşik kolon, en yüksek hızda 1 dk. santrifüj edildi.

Total RNA’nın (küçük RNA’ları da içeren) elüsyonu için kolon 1.5 ml’lik yenibir toplama tüpüne yerleştirildikten sonra 40 µl RNase-free su direkt olarak membran üzerine eklenerek 1 dk. $\geq 8000 \times g$ ‘de ($\geq 10,000$ rpm) santrifüj edildi. Elüsyon miRNA gibi küçük RNA’ların da yer aldığı total RNA’yı içermekteydi. Daha yüksek RNA konsantrasyonu elde

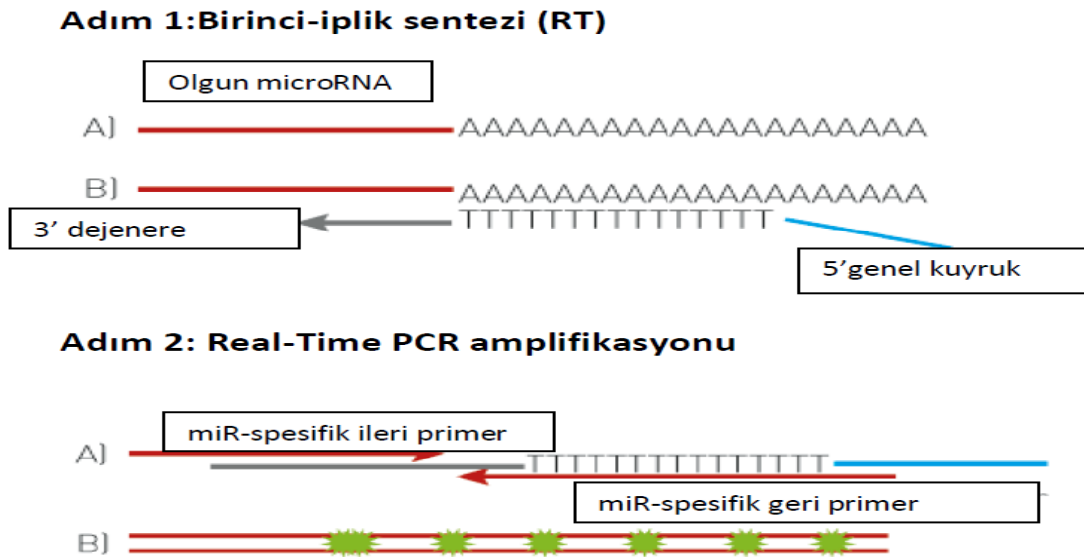
edilmek istenirse ilk elüsyonu kullanarak tekrar ikinci bir elüsyon gerçekleştirilebilir durumdaydı.

3.4.2.RNA miktarlarının ölçümü ve kalite kontrolü

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260/280 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlendi. Ölçümler her bir örnekten 1,5µl kullanılarak Nanodrop, Thermo Scientific aletinde gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanlarının oranı ile kontrol edilerek, ideal saflıkta kaliteli RNA'nın A260/ A280 ve A260 /A230 absorban oranının $\geq 1,8$ olması beklendi. Nanodrop'la spektrofotometrik ölçümün yanı sıra RNA' nın yeterli moleküler ağırlığa sahip olduğunun doğrulanması ve degradasyonunun kontrolü için Agilent 2100 Bioanalyzer sistemi kullanıldı. Analizler 250ng total RNA örneği ile Agilent Bioanalyzer ve RNA 6000 Nano Assay Reagent Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Jel görüntüsünde 28S ve 18S ribozomal bantların keskin bir şekilde görünmesi amaçlandı. Yeterli ağırlıkta olmayan ve degradasyon görülen örnekler çalışma dışı bırakılarak işaretleme ve hibridizasyon aşamalarına dahil edilmedi.

3.4.3.miRNA Ekspresyon Analizi

miRNA'ların ifadeleri Real Time PCR ile araştırıldı. Bunun için microRNA'ya özgül LNA temelli, Exiqon firmasına ait "miRCURY LNATM Universal RT microRNA system" çalışma kiti kullanıldı.



Şekil 3: miRNA PCR Analizi

Bu kit ile total RNA'dan tek sarmal cDNA sentezlemek (1), sentezlenen cDNA'yı kalıp olarak kullanıp, özel LNA primerler ve SYBR green boya eşliğinde seçilen miRNA'ların gerçek zamanlı (real-time qPCR) kantitatif/nicel PCR (2) analizinin gerçekleştirilmesi amaçlandı.

3.4.4. Tek sarmal cDNA sentezi

Tek sarmal cDNA sentezi için "miRCURY LNATM Universal RT microRNA system" kitinin özelliği doğrultusunda "Universal cDNA synthesis kit" seti kullanıldı. Kit protokolü 20-25ng RNA başlangıç materyali ve kontrol amaçlı RNA spike-in ($10^9/\mu\text{l}$) kullanımını önermekteydi.

Kit protokolünün önerisi doğrultusunda, 96'lık plakada gerçekleştirilecek gerçek zamanlı PCR için, 20 μl 'lık cDNA sentez reaksiyonunda 22ng total RNA kullanıldığında, elde edilen cDNA' nın x110 kat seyreltilmesiyle gerçek zamanlı PCR'de kullanıma hazır 2200 μl 'lık yaklaşık 200 reaksiyonluk cDNA elde edildi.

Her 20ng RNA örneğinin, içine eklenecek 1 μl RNA spike-in (sentetik RNA) ile cDNA sentezlenmesi sağlandı. Sentezlenen spike-in cDNA, Universal RT kit içeriğindeki kontrol primer setleri yardımıyla amplifiye edilerek, kullanılan örneklerin amplifikasyonu ile karşılaştırıldı. Böylece kullanılan RNA örneklerindeki inhibitörlerin ve degradasyonun varlığı kontrol edildi.

96'lık bir plaka'da gerçek zamanlı PCR çalışması için cDNA sentezinde:

- i. Kit içeriğindeki bütün reaktifler buz üstünde çözünmeye bıraktı, çözünme sonrası bütün reaktifler belirtilen uygun koşullarda karıştırılarak kısa süre santrifüjlendi
- ii. Kullanılan total RNA toplamda 22 ng (son konsantrasyon 1,57ng/ μl) olacak şekilde 14 μl nükleaz-free su içine dilue edildi.

Reverse transkriptaz reaksiyonu, kit içeriğindeki reaktifler kullanılarak, reaksiyon başına olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı.

Reaktif	Hacim (µl)/reaksiyon başına	Son konsantrasyon/miktar
5X reaction buffer	4	1x
Enzyme Mix	2	1x
Kalıp total RNA	14	20-25 ng
Toplam Hacim	20	

iii. Reaksiyon karıştırılarak, 42°C’de 60 dakika inkübasyona, sonrasında da 95°C’de 5 dakika reverse transkriptaz enziminin inaktivasyonuna bırakıldı.

iv. Gerçek zamanlı PCR aşamasına geçildi.

3.4.5. Gerçek Zamanlı PCR

Bu aşamada degranülasyonu saptanan miRNA’ların bir grubunun (örneğin en az 10 tanesinin) o miRNA’lara özgü LNATM primerler ve nicel miktar tayini için karşılaştırılabilecekleri, verilerin normalizasyonu için gerekli olan 2 veya 3 referans gene özgü primerler ve SYBR Green kullanılarak gerçek zamanlı PCR ile ifadeleri ve ifade seviyeleri saptandı.

Normalizasyon ile incelenen konunun dışındaki biyolojik varyasyonların sonuçlar üzerindeki etkisini ortadan kaldırmak amaçlanır. Bu husus gerçek zamanlı PCR’nin doğru analizi ve yorumu için oldukça önemlidir. Genellikle normalizasyon için ifadesi sabit, istikrarlı referans genler seçilir. Benzer şekilde birden fazla endojen kontrol geni (referans) olması tavsiye edilir ve önemli olan seçilecek genin incelenen bütün örnek aralığında istikrarlı olarak ifade edildiği bilinen bir gen(ler) olmasıdır. Bu amaçla, küçük kodlamayan RNA’lar (sRNAs veya sncRNAs) (örn. 5S, U6, SNOR’lar) veya literatürde istikrarlı olarak ifadesi görüldüğü bildirilmiş miRNA (miR-191, miR-103, let-7a, ve miR-16) genleri referans olarak seçilebilir.

Seçilen miRNA’ların ifadelerinin araştırılması amacıyla belirlenen miRNA ve referans genlere özgül primerleri içeren Exiqon, “MicroRNA Pick&Mix PCR panels” panelleri kullanılarak reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı. Çalışmalarda her reaksiyon için 3’er replika kullanıldı.

i. Öncelikle 2xSYBR Green master karışımı 1:1 oranında x110 kere dilue edilen cDNA örneği ile karıştırıldı.

Reaktifler	Hacim (μ l), 96-kuyucuklu plaka için
SYBR green master mix	10
Dilüe edilmiş cDNA kalıbı	10
Her bir kuyucuğa eklenecek toplam hacim	20

ii. Panel kullanım öncesi santrifüj edilerek her bir kuyucuğa 20 μ l olacak şekilde reaksiyon karışımı konularak tekrar santrifüj edilerek aşağıdaki koşullarda, termal döngü programında RT-PZR cihazına (Light Cycler® 480, ROCHE) konuldu.

Denatürasyon	95°C, 10dak.
40 döngü amplifikasyon	95°C, 10 sn
	60°C 1 dak. ramp-rate 1.6°C/s*
	Optik okuma
Melting curve analizi(erime eğrisi)	

3.4.6.Data Analiz

Verilerin analizi $\Delta\Delta$ CT metodu kullanılarak “Light Cycler® 480 Quantification Software” adı verilen bir bilgisayar programı yardımıyla yapıldı. Daha ileri data analizlerinde, çalışılan kitin firmasına ait GenEx qPCR analysis software (www.exiqon.com/mirna-pcranalysis) kullanıldı.

3.4.7.Örneklerin Çalışılması ve Veri Analizi

Eksi 80 C derecede bekletilen plazma örneklerinden mi-RNA örnekleri revers transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA’ya dönüştürüldü ve daha sonra real-time PCR reaksiyonuna sokularak Tablo 1’de belirtilen miRNA ifadeleri araştırıldı. Çalışmada kardiyak hipertrofi ile ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarında tespit edilen 11 adet mikro RNA’ların düzeylerine bakıldı. Ct (cycle of threshold) değeri 40’dan büyük olanlar çalışmaya alınmadı. Çalışmada mikroRNA referans gen (housekeeping gen) SNOR48 kullanıldı.

Çalışmada hastalar üç grubu ayrıldı. Bu çalışmada araştırılan mi-RNA'ların kardiyak hipertrofi üzerinde etkilerini araştırmak amacıyla HKM ve kontrol grubundaki ekspresyon düzeylerine bakıldı, buna ek olarak hipertansiyon grubu da dahil edilerek mevcut mi-RNA değerlerindeki değişimin HKM' ye mi özgü olduğu yoksa kardiyak hipertrofi ile mi ilişkili olduğuna bakıldı.

Tablo 1: Mikro-RNA Listesi

no	mikro-RNA
1	miR-1
2	miR-21
3	miR-22
4	miR-23a
5	miR-29
6	miR-30
7	miR-34
8	miR-133
9	miR-199a
10	miR-208
11	miR-290

3.4.8.İstatistiksel Yöntem

Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Normal dağılan nicel verilerin gruplar arası karşılaştırması tek yönlü varyans analizi ile incelendi ve tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma biçiminde gösterildi. Normal dağılmayan nicel verilerin gruplar arası karşılaştırması Kruskal Wallis varyans analizi ile incelendi ve tanımlayıcı istatistikler medyan (25-75 persantil) biçiminde gösterildi. LV MASS ve LVMASS index değerler ile ilişkisini incelemek için değişkenlerin normal dağılıma uygunluğuna göre Spearman Korelasyon testi ya da Pearson korelasyon testi kullanıldı. Nitel verilerin karşılaştırılmasında Ki-kare analizi kullanıldı ve tanımlayıcı istatistikler frekans (yüzde) biçiminde gösterildi.

İstatistiksel analizler için SPSS for Windows version 15 paket programı kullanıldı ve $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Çalışmaya alınan 26 HKM, 25 hipertansif ve 24 kontrol grubu hastası arasında cinsiyet dağılımı açısından kadın/erkek oranı sırasıyla (%42,3/%57,7), (%60/%40) ve (%54,2/%45) olarak hesaplandı ve cinsiyet dağılımları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p=0,435$) (Tablo 2). Çalışmaya alınan gruplar arasında yaş ($p=0,093$), boy ($p=0,441$) ve kilo ($p=0,128$) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Yaş, boy ve kilo dağılımları daha detaylı biçimde Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2:Cinsiyet-Yaş-Boy-Kilo Dağılımları

	Kontrol (n=24)	Hipertansiyon(n=25)	HKM (n=26)	p
Cinsiyet	13/11	15/10	11/15	* 0,435
Kadın /Erkek	(%54,2/%45,8)	(%60/%40)	(%42,3/%57,7)	
Yaş	46,88±7,708	53,48±10,304	52,23±12,539	0,093
Boy	165,63 ±7,649	167,0±5,508	167,92±5,713	0,441
Kilo	78,9±15,966	82,7±16,108	83,2±14,877	0,128

*kikare değeri:1,665

Grupların özgeçmişlerine bakıldığında sigara, alkol, koroner arter hastalığı ve diyabetis mellitus açısından fark yoktu. Gruplar arasında ilaç kullanım sıklığı yönünden bakıldığında HKM grubu daha fazla oranda beta bloker (BB) kullanmaktaydı ($p:0,00012$). Hipertansiyon grubu hastalarında diğer gruplara oranla anjiyotensin konverting enzim inhibitörü (ACEi) kullanma sıklığı daha fazlaydı ($p:0,046$). Benzer şekilde hipertansiyon grubu hastaları diğer gruplara oranla daha sık anjiyotensin reseptör blokeri (ARB) ($p:0,01$), kalsiyum kanal blokörleri (KKB) ($p:0,0001$) ve diüretik ($p:0,001$) kullanmaktaydı. HKM grubu hastalarında diğer gruplara oranla antitrombosit kullanım sıklığı daha fazlaydı ($p:0,035$). Hipertansiyon grubu hastaları diğer gruplardaki olgulardan daha sık statin kullanmaktaydı ($p:0,013$) (Tablo 3).

Tablo 3:Risk faktörleri ve ilaç kullanımı

	Kontrol (n=24)	Hipertansiyon(n=25)	HKM (n=26)	p
Sigara	8 (%33,3)	9 (%36)	12 (%46,2)	0,613
Alkol	5 (%20,8)	5 (%20)	3 (%11,5)	0,342
DM	5 (%20,8)	7 (%28)	3 (%11,5)	0,337
KAH	2 (%8,3)	3 (%12)	1 (%3,8)	0,561
BB	0	13 (%52)	19 (%73,1)	0,00012
ACE	1 (%4,2)	8 (%32)	6 (%23,1)	0,046
ARB	1 (%4,2)	12(%48)	4 (%15,4)	0,01
KKB	0	13 (%52)	6 (23,1)	0,0001
Diüretik	0	11(%44)	7 (%26,9)	0,001
Antitrombosit	3 (%12,5)	8 (%32)	12 (%46,2)	0,035
Statin	1 (%4,2)	7 (%28)	1 (%3,8)	0,013

Çalışmaya alınan HKM hasta sayısı toplam 26 olup bunlardan 19'u septal tip HKM, 3'ü apikal tip HKM VE 4'ü ise konsantrik tip HKM hastası idi. HKM hastalarının 11'inde (%42,3) SAM, 14'ünde(%53,8) LVOT'ta gradient saptandı. Yine çalışmaya alınan HKM hastalarının 22'sinde sinüs ritmi, 4'ünde AF mevcuttu. HKM hastalarının % 50'sinde ailesel geçiş öyküsü vardı. HKM vakalarının 4'ünde (%15,4) senkop/VT /Arrest öyküsü bulunmaktaydı.

Çalışmaya alınan miRNA-1, miRNA-21, miRNA-22, miRNA-23a, miRNA29, miRNA30, miRNA-34, miRNA133, miRNA199a, miRNA 208, miRNA 290 içerisinde miRNA 208 ve miRNA290'nın ekspresyonu gruplar arasında yetersiz olduğu için istatistiksel olarak değerlendirilmeye alınmadı. Gruplar arasında miRNA'ların ekspresyonu açısından istatistiksel anlamlı fark bulunamadı.

Tablo 4: miRNA Ekspresyon Değerleri

miRNA	Grup	Ortalama $\pm$ SS	Min-Max	p
miRNA-1	kontrol	0,00469 $\pm$ 0,0083	0,00005 - 0,0318	0,594
	hipertansiyon	0,00251 $\pm$ 0,00185	0,00015 - 0,00754	
	HKM	0,00318 $\pm$ 0,00514	0,00031 - 0,0178	
miRNA-21	kontrol	3,676 $\pm$ 7,645	0,0384 - 38,06	0,858
	hipertansiyon	2,636 $\pm$ 3,928	0,00003 - 14,68	
	HKM	2,886 $\pm$ 7,812	0,00103 - 40,48	
miRNA-22	kontrol	0,482 $\pm$ 0,993	0,00561 - 4,924	0,989
	hipertansiyon	0,447 $\pm$ 0,629	0,00025 - 2,764	
	HKM	0,456 $\pm$ 0,885	0,0219 - 3,977	
miRNA-23	kontrol	0,605 $\pm$ 1,618	0,00139 - 7,792	0,617
	hipertansiyon	0,542 $\pm$ 1,175	0,0215 - 5,84	
	HKM	0,293 $\pm$ 0,449	0,00375 - 1,681	
miRNA-29	kontrol	0,069 $\pm$ 0,176	0,00233 - 0,8763	0,741
	hipertansiyon	0,0927 $\pm$ 0,184	0,00143 - 0,9063	
	HKM	0,0558 $\pm$ 0,13	0,00372 - 0,6474	
miRNA-30	kontrol	0,0117 $\pm$ 0,037	0,00018 - 0,1697	0,618
	hipertansiyon	0,019 $\pm$ 0,049	0,00038 - 0,2124	
	HKM	0,007 $\pm$ 0,00932	0,00036 - 0,0296	
miRNA-34	kontrol	0,0205 $\pm$ 0,068	0,00057 - 0,3	0,319
	hipertansiyon	0,00403 $\pm$ 0,00275	0,00037 - 0,00962	
	HKM	0,00544 $\pm$ 0,00378	0,00151 - 0,0154	
miRNA-133	kontrol	0,00209 $\pm$ 0,00235	0,00023 - 0,00725	0,596
	hipertansiyon	0,00692 $\pm$ 0,026	0,00033 - 0,121	
	HKM	0,00299 $\pm$ 0,00396	0,00025 - 0,0144	
miRNA-199	kontrol	0,072 $\pm$ 0,25	0,00148 - 1,167	0,341
	hipertansiyon	0,0179 $\pm$ 0,027	0,00011 - 0,1278	
	HKM	0,0168 $\pm$ 0,0322	0,00101 - 0,1618	

Çalışmaya alınan HKM, HT ve kontrol grupları sol ventrikül kitle indeksi (LV MASS indeks) ve miRNA ilişkisi açısından değerlendirildi. Gruplar arasında miRNA ekspresyonu ile LV MASS indeksi arasında ilişki tespit edilemedi (Tablo 5).

Tablo 5: LV MASS ve miRNA İlişkisi

miRNA'LAR	LV MASS İNDEKSİ P değeri
miRNA-1	0,904
miRNA-21	0,444
miRNA-22	0,973
miRNA-23a	0,189
miRNA-29	0,736
miRNA-30	0,525
miRNA-34	0,451
miRNA-133	0,138
miRNA-199a	0,096

5.TARTIŞMA

MikroRNA (miRNA)'lar yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-25 nükleotid uzunluğunda küçük RNA molekülleridir. Hem HKM ve HT'nun başlangıcında ve ilerlemesinde, miRNA'lar hedefledikleri genin karakterine göre hiperplazi veya hipoplazi gelişmesine sebep olmaktadır.

Çok sayıda canlıda miRNA'lar tespit edilmiş ve bunların 1500 tanesi kadarı insanlarda bulunmaktadır (188). İnsanlarda protein sentezinin %60'dan fazlasının miRNA'larla regüle edildiği düşünülmektedir, bu nedenle hastalıkların gelişiminde mikroRNA'ların rol oynayabileceği ihtimali kuvvet kazanmaktadır (189). MikroRNA'ların periferik kan ve diğer vücut sıvılarında bulunduğunun gösterilmesi bunların hastalıkların tanı ve izleminde belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür (176,177,190-192). Bu alanda çok sayıda çalışmalar yapılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada miR-27a, miR-199a-5p, miR-26a, miR-145, miR-133a, miR-143, miR-199a-3p, miR-126-3p, miR-29a, miR-155, miR-30a ve miR-21'in kardiyak hipertrofi ile anlamlı derecede ilişkili olduğu ve HKM'li hastaların plazmasında arttığı ortaya konmuştur. Bununla beraber miR-199a-5p, miR-27a ve miR-29a hipertrofi ile ilgili olduğu ve sadece miR-29a'nın fibrosis ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (193).

miRNA-1 kalpte en bol bulunan ve kas dokusuna spesifik olup kardiyak gelişim ve farklılaşmasında önemli rol oynayan bir mikro-RNA'dır (194,195,196). Ayrıca miRNA-1 kardiyak hipertrofiyi, kalsiyum bağımlı sinyal yoluyla kontrol eder (197-199).Yakın zamanda Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada rat kardiyomyositlerinde twinfilin denilen bir proteinin miRNA-1 hedefi olduğu gösterilmiştir (194). Bu protein hücre iskeletinde bulunan, hücre büyümesini uyaran ve aktinin yapısına katılarak hücre hareketini sağlayan bir hücre iskelet proteinidir. Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miRNA-1'in TWF-1 proteinini inhibe ederek hücre yüzey alanını küçülttüğü ayrıca miRNA-1 etkisinin engellenmesinin hipertrofiye neden olduğu gösterilmiştir (194). Sayed ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı başka bir çalışmada kardiyak hipertrofi esnasında mikro-RNA ekspresyonu incelenmiştir. Aortik bantlama işlemi ile ratların sol ventrikülü hipertrofiye uğratılmış, kontrol grubu ratlarla yapılan karşılaştırmalarda sol ventrikülü hipertrofik olan ratların miRNA-1 ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir (21). Zhang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada miRNA-1'in artmış ekspresyonunun atriyoventriküler bloklara neden

olduğu ortaya konmuştur (200). Care ve arkadaşlarının çalışmasında ise hipertrofik kalp miyozitlerinde mi-RNA-1'in ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (197). Bizim çalışmamızda her ne kadar anlamlılık olmasa da (p: 0,594) mi-RNA-1'in kontrol düzeylerinin HT ve HKM grubundan büyük olması bu çalışmaları desteklemektedir. Bu çalışmada miRNA-1 ekspresyonu bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

miR-21 veya miR-18b'nin endojen inhibisyonu hipertrofik büyümeyi arttırmaktadır (201). Kardiyak remodeling sürecinde miR-21'in yüksek upregülasyonunun bazı hastalıklarda rol aldığı gösterilmiştir. Fakat kardiyak strese cevap olarak miR-21 fonksiyonu net değildir. Miyozit kültürlerinde miR-21 hem prohipertrofik hem de antihipertrofik olduğu gösterilmiştir (167,201).Thum ve arkadaşları ratlarda aortik bağlama işlemi yaparak kalpte kardiyak hipertrofi ve fibrozisi indüklemiş ve bu sırada miR-21 artışı gözlemlemişlerdir. Daha sonra bir oligonukleotid (antagomir) aracılığıyla miR-21'in inhibe edildimesi ile bu fibrozis ve hipertrofinin engellendiğini rapor etmişlerdir. Bu yararlı etkiler miR-21'in hedef transkript olan SRY -1 (Sprouty-1) depresyonuna bağlanmıştır ve bu sonuç kardiyak fibroblastta spesifik MAP kinaz sinyal yolunun inhibisyonu ile gerçekleşmektedir (167). Patrick ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada mutasyon ile miR-21'i delesyona uğratarak inhibe edilmiş farelerle normal fareler karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada aortik ligasyon, kalsinörin, anjiotensin ve MI modeli üzerinden bu dört uyarı ile kalpte stres oluşturulmuş ve böylece miR-21'in patolojik kardiyak remodeling üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Mutant olmayan fare grubunda tüm stres faktörlerine yanıt olarak miR-21'in belirgin şekilde upregüle olduğu izlenirken iki grup arasından hipertrofi, kardiyak remodeling, MI ile oluşturulan skar dokusu açısından bir fark tespit edilmemiştir. Hatta mutant farelerde kalp dokusunun toplam vücut ağırlığına oranında artış bulunmuştur (202). Patrick ve arkadaşları daha sonra antimiR-21 verilen farelerle verilmeyenleri karşılaştırmıştır. Gerek aortik bantlama operasyonu ile indüklenen miR-21 artışı, gerekse anjiotensin II ile uyarılan miR-21 artışı antimiR-21 tarafından etkili bir şekilde inhibe edilmiş fakat kontrol grubunda inhibisyon olmamıştır. Bu gruplara bakıldığında fenotip, kardiyak fonksiyon, miyozin ağır zincir, kardiyak remodeling açısından fark tespit edilmemiştir. Bizim çalışmamızda gruplar arasında miR-21 ekspresyonu açısından gruplar arasında belirgin bir fark izlenmemiş olsa da kontrol grubunun değerleri HT ve HKM grubunun değerlerinden yüksektir (p:0,858). Bu bilgi Patrick ve arkadaşlarının miR-21'in

kardiyak hipertrofi ve remodelingde etkili olmadığı ve karşı kompanzatuvar mekanizmaların etkili olduğu bilgisiyle kısmen örtüşmekle beraber yine de bu çalışmaya ters düşüyor gibi görünmektedir. Çalışmanın farelerde gerçekleştirildiği düşünüldüğünde miRNA-21'in farklı türlerde farklı davranış gösterebileceğini düşünmekteyiz.

İskelet ve kas dokularında miR-22 ekspresyonu miR-1 ve miR-133 gibi oldukça spesifiktir ve dokularda bulunan miyoblastların büyümesinde ve farklılaşmasında önemli rol oynar (203). Daha önceki yapılan çalışmalarda miR-22'nin bir tümör supresör olduğu ve kanserli hücrelerde yaşlanmayı indükleyerek apoptozisi arttırdıkları gösterilmiştir (204,205). Gurha ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kalp üzerinde stres oluşturularak indüklenen kardiyak hipertrofide miR-22'nin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (206). Ratlarla yapılan başka bir çalışmada miR-22'nin miyoblast farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir (203). Huang ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada değişik mutant fareler oluşturularak stres faktörlerine bağlı olarak kardiyak hipertrofi ve remodeling üzerinde miR-22 etkinliğini araştırmışlardır (207). Bu çalışmada fenilefrin gibi kardiyak hipertrofiyi uyaran ajanların miR-22 inhibisyonu sonrası bu etkisinin azaldığı gösterilmiştir. Daha sonra miR-22 etkisini taklit eden ajanlar kardiyomiyozitlere enjekte edildiğinde hücre yüzey alanının arttığı saptanmış ve bu ratlarda, ANP, BNP, α -aktin, ve β -MHC gibi normalde fetal yaşamda aktive olan genlerin yeniden aktive olduğu gözlenmiştir. Isoprotenol (ISO) gibi beta agonistler kardiyak hipertrofiyi ve fibrozisi arttırmaktadır (208). miR-22'si inhibe edilmiş mutant farelerle kontrol grubu fareler karşılaştırıldığında mutant farelerde ISO'nun, uyarılan kardiyak hipertrofiyi belirgin şekilde azalttığı saptanmıştır (207). Ayrıca miR-22'nin fonksiyonel kaybı mutant farelerde fibrozisi hızlandırmış böylece hem sistolik fonksiyonda azalma hem de dilate kardiyomiyopatiye gidişi hızlandırmıştır. Bizim çalışmamızda miR-22 ekspresyon düzeyinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ve değerler birbirine çok yakındır. LV kitle indeksi açısından gruplar analiz edildiğinde yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır (p:0,989). Bunun nedeninin miRNA-22'nin insanlarda hedef ve etki mekanizmasının farklı olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz. İnsanda miR-22 için sirtuin 1 (sirt-1), human histone deacetylase (HDAC4) gibi çok sayıda hedef gen tanımlanmış olması bu düşüncemizi desteklemektedir (205,207).

Yapılan bir çok çalışmada miR-23a kardiyak hipertrofi ile ilişkili bulunmuştur (21,159,209). Lin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada miR-23a'nın kardiyak hipertrofide etki mekanizması araştırılmıştır (210). Bu çalışmada hücre çekirdeğinde bulunan, bir

transkripsiyon faktörü olan ve kardiyak hipertrofi sinyal yolu olan NFATc3 (Nuclear Factor of activated T Cells) (211,212) ile antihipertrofik faktör sinyal yolu olan MuRF1'nin (muscle specific ring finger protein-1) (213) kardiyak hipertrofideki etkilerinin devam etmesi için miR-23a'nın gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. miR-23a'nın hipertrofi üzerine etkilerini Foxo3a proteini ile gerçekleştirdiği başka bir çalışmada ortaya konmuştur (214). Ayrıca miR-23a, kardiyak hipertrofide etkili protein kinaz A (215), Egr-1 (early growth response 1) (216), Pttg1 (Pituitary tumor-transforming gene-1) (217) gibi bir çok hedef geni regüle eder. Bizim çalışmamızda gruplar arasında miR-23a ekspresyonu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p:0,617). Ayrıca kontrol grubunun değerleri diğer iki gruptan büyüktü ve en küçük değerler HKM grubuna aitti. Bu bilgi, miR-23a'nın insanlarda aktivitesini aydınlatmakta, ek olarak miR-23a'nın etki mekanizmasının ve hedef genlerinin insanlarda farklı olabileceğini de düşündürmektedir.

miR-29 kardiyak remodeling ve fibrozisle ilişkili bir miRNA'dır (218). Boon ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kollejen ve elastin gibi ekstraselüler matrix proteinlerinin regülasyonunda miR-29'nin önemli rol aldığı gösterilmiştir (219). Yine bu çalışmada miR-29'un etkisinin inhibe edilmesi aortada dilatasyona neden olmuştur. Van Rooij ve arkadaşları MI sonrası oluşan kardiyak fibroziste miR-29'un down regüle olduğunu göstermişlerdir (18). Hipertrofik kardiomyopatide de ekstraselüler matrix proteinlerinden özellikle de kollojen sentezinde bir artış mevcuttur. Bizim yaptığımız çalışmada gruplar arasında miR-29 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış olsa da; HT grubunun ekspresyonları diğer gruplardan büyüktü ve HKM grubunun değerleri de kontrol grubundan büyüktü (p:0,741). İnsanlarda miR-29'un kardiyak hipertrofi etkisi fibrozis kadar açık olmayabilir. Literatüre bakıldığı zaman miR-29'un kardiyak hipertrofide etkisi henüz gösterilmemiştir. miR-29 üzerine daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulduğu ortadadır.

Yin ve arkadaşları kardiyak hipertrofide miR-30 etkisini araştırmışlardır (220). Bu çalışmada fare modellerinde aortik daraltma yoluyla kardiyak hipertrofi oluşturulmuş ve daha sonra miR-30 ekspresyon düzeylerine bakılmış ve bu fare modellerinde miR-30 ekspresyonun azaldığı gösterilmiş. Yine bu çalışmada miR-30'un downregüle olması ile otolizi aktive ettiği gösterilmiştir (220). Zho ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kalp yetersizliği ile ilişkili 40 çeşit mikroRNA taranmıştır. Bu amaçla 22 kalp yetersizlikli hasta, 18 kontrol grubu ve 9 adet fetal kan örneğinde miRNA'lar karşılaştırılmış ve miR-30'un hem fetal kanda hem de kalp yetersizlikli hastalarda yüksek olduğu bulunmuştur (221). Bunun sonucunda kalp yetersizliği

gibi kardiyak patolojilerde mikroRNA'ların fetal dönemdeki seviyelerine dönme eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada 18 akut MI hastası ve 30 kontrol grubu karşılaştırılmıştır (222). Real time PCR yöntemi ile yapılan bu çalışmada miR-30'un periferik kanda MI sonrasında belirgin şekilde eksprese olduğu gösterilmiş ve bu artış 4-8-12'inci saatlerde devam etmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada miR-30 düzeyi açısından gruplar arasında istatistiksel fark saptanmamıştır (p:0,618). Yin ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da farelerde olup hücre kültürleri kullanılmıştır. Bu açıdan bakıldığı zaman insanlarda miR-30'un kardiyak hipertrofi ile ilişkisi net olmayabilir ya da Long ve arkadaşların çalışmasında (222) olduğu gibi kardiyak injuri yaratan durumlarla ile ekspresyonu değişiyor olabilir.

miR -34a yaşla ilişkili olarak kalpte ekspresyonu artan yaşlanmayla ilişkili başka bir mikroRNA'dır (223). Boon ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kardiyak yaşlanma ile ilişkili olarak ortaya çıkan, artmış apoptozis, fibrin birikimi, hipertrofi üzerinde miR-34a etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada miR-34a'nın yaşla ilişkili ortaya çıktığı, kalpte upregüle olduğu ve miR-34a'nın inhibe edilmesi halinde MI sonrası kardiyak fonksiyonların yeniden kazanılmasında yarar sağladığı, anjiyogenezi arttırdığı ve yaşlanma ile ortaya çıkan olumsuz sonuçları azalttığı gösterilmiştir (224). Bernardo ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada aortik daraltma operasyonu yapılarak arttırılan basınç yükün, hipertrofi ve kardiyak remodelingi indüklediği gösterilmiş, ayrıca MI modeliyle kardiyak stres ve remodeling uyarılmış farelerde miR-34a'nın inhibisyon etkisi araştırılmıştır (225). Bu çalışmada farelerde miR-34a'nın inhibe edilmesinin MI sonrası kardiyak remodelingi azalttığı, aortik daralma sonucu oluşturulan sistolik fonksiyon bozukluğunu düzelttiği, KC konjesyonunu ve kardiyak fibrozisi azalttığı, ayrıca anjiyogenezi arttırdığı gösterilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada gruplar arasında miR-34a ekspresyonu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş olmasına rağmen kontrol grubunun değerlerinin HT ve HKM grubunun değerlerinden büyük olması yapılan çalışmaları desteklemektedir (p:0,319). Boon ve ark. ile Bernardo ve ark.'nın çalışmalarında miR-34a gen ekspresyonunun p53 ile düzenlendiği ifade edilmektedir. Kardiyak hipertrofide p53 fonksiyonu ve miR-34a etkisi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

miR-133a kardiyak hipertrofi ile ekspresyonu değişen bir diğer mikroRNA'dır (22). Özellikle kalp ve iskelet dokusunda en fazla bulunan mikroRNA'dır (203). Care ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hipertrofik miyokartta miR-133a ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada miR-133a'nın bir antimiRNA ile inhibe

edilmesinin ratlarda hipertrofik kardiyomiyopatiye neden olduğu saptanmıştır (197). Başka bir çalışmada kardiyak hipertrofi indüklenmiş farelerden miR-133a'nın ekspresyonunun artışının hipertrofiyi azaltmadığı gösterilmiştir (226). Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ratlarda kardiyak hipertrofi indükleyen herhangi bir durumda ekspresyonu artan ve kardiyomiyozitlerde hipertrofi oluşturan NFATc4 sinyal yolunun miR-133a tarafından regüle edildiği gösterilmiştir (227). Ayrıca miR-133a'nın inhibe edilmesini hem NFATc4 düzeyini hem de kardiyak hipertrofiyi arttırdığı gözlenmiştir. Liu ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada kardiyak hipertrofi oluşturulmuş ratlarda hidrojen sülfür (H₂S)'ün kardiyovasküler patoloji ve hastalıklarda önemli rol oynadığı gözlenmiştir (228). Bu çalışmada hidrojen sülfür sonrası miR-133a'nın arttığı gösterilmiş ve kardiyak hipertrofide belirgin azalma gözlenmiştir. Ayrıca yakın zamanda miR-133a'nın akut myokard enfarktüsünün ve altta yatan bir koroner arter hastalığının göstergesi olabileceğini gösteren bir çalışma yayınlanmıştır (229). Bizim çalışmamızda gruplar arasında miR-133 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p:0,596). Bununla birlikte bulduğumuz sonuçlarda HT ve HKM grubunun değerleri kontrol grubuna göre yüksektir ve HT grubunun değerleri de HKM grubunun değerlerinden yüksektir. Bulmuş olduğumuz sonuçlar literatürle kısmen ters düşmektedir. Ayrıca literatüre bakıldığında zaman miR-133a'nın kardiyak hipertrofi ile ilişkisine dair çelişkili sonuçlar vardır. miR-133a'nın kalp ile ilgili patolojilerde daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğu aşıkardır.

mikro-RNA199a kardiyak gelişim ve hipertrofi ile ilişkili olduğu gösterilmiş başka bir mikro-RNA'dır (21). Song ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı çalışmada aort daraltma işlemi yapılarak hipertrofi oluşturulmuştur. 1, 4, 8 ve 12'nci haftalarda mikroRNA değişim düzeylerine bakılmıştır. 12 haftanın sonunda miR-199a'nın 10 kat arttığı gösterilmiştir (230). Ayrıca miR-199a'nın inhibe edilmesinin kardiyomiyozitlerde hipertrofiyi azalttığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada HIF-1 α (Hipoksia İnducible Factor 1-alfa) ve sirtulin 1 (Sirt-1) moleküllerinin kardiyak kontraksiyon ve hipertrofi ile ilgili olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu proteinleri salgılatan genlerin miR-199a'nın hedef genleri olduğu gösterilmiştir (231). Son dönem dilate kardiyomiyopatili hastalarda yapılan başka bir çalışmada miR-199a'nın ekspresyonunun downregüle olduğu gösterilmiştir ve bunun da hücre içi proteazları aktive ederek kardiyak dilatasyon sırasında kardiyak kitlede azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (232). Bizim çalışmamızda gruplar arasında kardiyak hipertrofi açısından istatistiksel fark olmasına rağmen miR-199a ekspresyonu açısından istatistiksel olarak

anlamalı fark bulunmamıştır (p:0,341). Bununla beraber kontrol grubunun değerleri HT grubunun değerlerinden, HT grubunun değerleri HKM grubunun değerlerinden büyüktür. Bu bulgu literatürle tezat teşkil etmektedir.

miRNA'ların birçoğunun kalpte gelişmekte olan hipertrofiyi önlemeye çalıştığı göze çarpmaktadır. İnsanlarda kalpten doku almanın güçlüğü, periferik kandan miRNA izolasyonundaki zorluklar nedeniyle miRNA ilgili birçok çalışma ancak hayvanlarda ve hayvan dokularında yapılabilmektedir.

Bizler bu çalışmamızda HKM'nin patogenezinde miRNA'nın rolünün olup olmadığını araştırdık. Çalışmamızdaki kısıtlayıcı faktörler arasında hastaların sadece tek bir merkezden toplanması, çalışma için az sayıda HT ve HKM hastası ve kontrol grubu alınması sayılabilir. Ayrıca çalışmanın periferik kanda yapılmış olması, diğer çalışmaların hayvan modellerinde gerçekleştirilmiş olması, insanlarda yapılmış olan çalışmanın az olması, yöntem olarak mikroarray, northern blot western blot ya da hücre kültürü gibi moleküler araştırma teknikleri haricinde real time PCR yönteminin kullanılması ve birçok miRNA değerlerine bakılması çalışmanın kısıtlayıcı noktalarıdır. Hasta grupları ve kontrol grubu gen polimorfizmi açısından karşılaştırıldığında her ne kadar anlamlılık bulunmasa da her grubun miRNA değerlerinin ortalama ve standart sapma değerlerinin birbirinden farklı olması sebebiyle daha fazla hasta katılımının sağlandığı çalışmalarda anlamlılığın sağlanabileceği düşünülmektedir.

Kardiyak patolojilerin gelişiminde miRNA'nın aktif görev aldığı ortadadır. Daha geniş hasta gruplarının katılımı ve/veya daha fazla hayvan çalışmalarının yapılması bu konuda bilgi birikimini arttıracaktır. Ayrıca kardiyak patolojilerin patogenezinde miRNA'nın görevlerinin anlaşılmasında insanlardan alınan kardiyak doku örneklerinin aydınlatıcı olabileceği düşünülmektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada HKM ve HT'lu hastalarda miRNA'ların düzeyleri incelenerek hastalıklarla ilişkisi ortaya konmaya çalışıldı. Bunun sonucunda; miRNA gen polimorfizmi ile hastalıklar arasında anlamlı fark bulunmadığı, gen polimorfizmi ile erkek ve kadın cinsiyet arasında anlamlı fark bulunmadığı, miRNA ile LV İndeksi arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı sonucuna varılmıştır. miRNA gen polimorfizmi ile kardiyak patolojilerin ilişkisini ortaya koyabilecek daha fazla sayıda hasta ile çalışma yapılması gerekmektedir.

ÖZET

Hipertrofik Kardiyomiyopati ile mikro-RNA'lar Arasındaki ilişkinin Araştırılması

Dr.Mehmet Akdeniz

Uzmanlık Tezi, Kardiyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç.Dr. Ufuk Eryılmaz

Ocak-2014

Amaç: Hipertrofik Kardiyomiyopati (HKM) miyokardiyal hipertrofiye neden olan birincil kalp kası hastalığıdır. MikroRNA'lar (miRNA) proteinlerin sentezinin düzenlenmesinde rol alan hem hücre içinde hem de dolaşımda bulununabilen küçük RNA'lardır. Bu çalışma literatürde kardiyak hipertrofi ile ilişkili olduğu gösterilmiş 11 adet mikro-RNA'nın periferik kanda ekspresyon düzeylerine bakılarak HKM'ye özgü miRNA'lar olup olmadığını araştırmak amacıyla yapıldı.

Yöntem: Çalışmaya mart 2012 ve mart 2013 tarihleri arasında kliniğimize başvuran Hipertrofik Kardiyomiyopati tanısı alan 26 hasta, hipertansif sol ventrikül hipertrofisi tanısı alan 25 hasta ile 24 kontrol hastası alındı. Kan örnekleri alınıp 11 tane miRNA'nın ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle araştırıldı. miRNA ekspresyon seviyeleri 3 grup arasında karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmaya alınan gruplara arasında miR-1, miR-21, miR-22, miR-23a miR-29, miR-30, miR-34, miR-133 ve miR-199a ekspresyonu seviyeleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Her üç grupta da miR-208 ve miR-290 ise ekspresyonu yetersiz olduğu için istatistiksel değerlendirmeye alınmadı.

Sonuç: Çalışmaya alınan gruplara arasında miR-1, miR-21, miR-22, miR-23a miR-29, miR-30, miR-34, miR-133 ve miR-199a ekspresyonu seviyeleri açısından fark saptanmadı.

Anahtar kelimeler: Hipertrofik Kardiyomyopati, mikroRNA, Real time PCR

ABSTRACT

Investigation of the relationship between hypertrophic cardiomyopathy and micro RNAs

Dr. Mehmet AKDENİZ

Speacility Project, Cardiology Department

Project consultant: Yrd. Doç. Dr. Ufuk ERYILMAZ

January 2014

Aim: Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a heart muscle disease which primary causes myocardial hypertrophy. MicroRNAs (MiRNA) are small RNAs which involved in the regulation of protein synthesis in the cell and circulation. In this study, 11 micro-RNAs shown in the literature to be associated with cardiac hypertrophy were invastigated in peripheral blood by looking at the expression of miRNA. level whether it is specific to hypertrophic cardiomyopathy or not.

Methods: 26 patients with HCM, 25 patients with hypertension and 24 patients of control group referred to our department between March 2012 and March 2013 were enrolled into this study. Blood samples were taken and 11 miRNAs' expression levels were analyzed by RT-PCR method. miRNA expression levels were compared between three groups.

Results: miR-1, miR-21, miR-22, miR-23a miR-29, miR-30, miR-34, miR-133 and miR-199a expression levels were not difference between groups ($p>0,05$). miR-208 and miR-290 levels have not been evaluated because of inadequate expression.

Conclusion: miR-1, miR-21, miR-22, miR-23a, miR-29, miR-30, miR-34, miR-133 and miR-199a expression levels did not show any difference in HCM, HT and control group.

Key words: Hypertrophic cardiomyopathy, Micro RNA, real time PCR

KAYNAKLAR

- 1- Davies MJ, The cardiomyopathies: an overview. *Heart*. 2000; 83 (4) : 469-474.
- 2- Maron BJ, Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 1997; 350: 127.
- 3- Maron BJ, Olivotto I, Spirito P, Epidemiology of hypertrophic cardiomyopathy-related death Revisited in a large non-referral-based patient population. *Circulation* 2000; 102 : 858.
- 4- Maron BJ, Casey SA, Hauser RG, Aeppli DM, Clinical course of hypertrophic cardiomyopathy with survival to advanced age. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42(5): 882-8.
- 5- Maron BJ, Hypertrophic cardiomyopathy: A systematic review. *JAMA*. 2002; 287 : 1308.
- 6- Spirito P, Bellone P, Harris KM, Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *N Eng J med*. 2000; 342 : 1778.
- 7- McKenna WJ, Behr ER, Hypertrophic cardiomyopathy: management, risk stratification and prevention of sudden death. *Heart*. 2002; 87: 169.
- 8- Burt VL, Whelton P, Rocella EJ, Prevalence of hypertension in the US adult population: result from the third national health and nutrition examination survey 1988-91. *Hypertension*. 1995; 25: 305.
- 9- Gandhi SK, Powers JC, Nemeir AM, The pathogenesis of acute pulmonary edema associated with hypertension. *N Eng J med*. 2001; 344: 17.
- 10- Bartel DP, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116: 281–297.
- 11- Ambros V. microRNAs: Tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001; 107: 823-826.
- 12- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N, Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight. *Nat Rev Genet*. 2008; 9: 102-114.
- 13- Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*. 2008; 132: 9-14.
- 14- Fazi F, Nervi C, MicroRNA: Basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovasc Res*. 2008; 79: 553-561.

- 15- Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP, The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008; 455: 64–71.
- 16- Elton TS, Khanl M and Terentyev D, MicroRNAs in cardiovascular disease F1000 Medicine Reports. 2011: 3: 10.
- 17- Thum T, Catalucci D, Bauersachs J, MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res*. 2008; 79: 562-70.
- 18- Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, Di- Maio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 13027-13032.
- 19- Hongyan Z, Guo-Chang F, Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis*. 2010: 138-149.
- 20- Wang X, Zhang X, Ren XP, Chen J, Liu H, Yang J, Medvedovic M, Hu Z, Fan GC. MicroRNA-494 targeting both proapoptotic and antiapoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Circulation*. 2010; 122: 1308-18.
- 21- Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2007; 100: 416-24.
- 22- Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al.. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy. *Am J Pathol*. 2007; 170: 1831-40.
- 23- Guo-Kun Wang, Jia-Qi Zhu, Jun-Tao Zhang, Qing Li, Yue Li, Jia He et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *European Heart Journal*. 2012; 31, 659–666.
- 24- Busk PK, Cirera S, MicroRNA profiling in early hypertrophic growth of the left ventricle in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 396 : 989–993.
- 25- Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT, Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics*. 2007; 31: 367-73.
- 26- Wang Z, Lu Y, Yang B, MicroRNAs and atrial fibrillation: new fundamentals. *Cardiovasc Res*. 2011; 89: 710-21.

- 27- Yang B, Lu Y, Wang Z, Control of cardiac excitability by microRNAs. *Cardiovasc Res.* 2008; 79: 571-580.
- 28- Palacín M, Reguero JR, Martín M, Molina BD, Morís C, Alvarez V, et al. Profile of microRNAs differentially produced in hearts from patients with hypertrophic cardiomyopathy and sarcomeric mutations. *Clinical Chemistry* 2011; 57: 1614-1616.
- 29- Teare D, Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *Br Heart J.* 1958; 20: 1-18.
- 30- Maron BJ, Mathenge R, Casey SA et al. Clinical profile of hypertrophic cardiomyopathy identified de nova in rural communities. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 33: 1590-95.
- 31- Zou Y, Song L, Wang Z et al. Prevalence of idiopathic hypertrophic cardiomyopathy in Chinese- a cross-sectional population-based echocardiographic analysis of 8080 adults. *Am J Med.* 2004; 116: 14-8.
- 32- Hada Y, Sakamoto T, Amano K et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in an outpatient population referred for echocardiographic study. *Am J Cardiol.* 1994; 73: 577-80.
- 33- Maron BJ, Moller JH, Seidman CE et al. Impact of laboratory molecular diagnosis on contemporary diagnostic criteria for genetically transmitted cardiovascular diseases. Hypertrophic cardiomyopathy, long-QT syndrome, and Marfan syndrome. [A statement for health care professionals from the Councils on Clinical Cardiology, Cardiovascular Disease in the Young, and Basic Science, American Heart Association]. *Circulation.* 1998; 98: 1460-71.
- 34- Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S et al. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1248-57.
- 35- Marian AJ, Pathogenesis of diverse clinical and pathological phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet.* 2000; 355(9197): 58-60.
- 36- Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, et al. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1997; 336(11): 775-85.
- 37- Lankford EB, Epstein ND, Fananapazir L, et al. Abnormal contractile properties of muscle fibers expressing beta-myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1995; 95: 1409-14.

- 38- Watkins H, Seidman CE, Sediman JG, et al. Expression and functional assessment of a truncated cardiac troponin T that causes hypertrophic cardiomyopathy. Evidence for a dominant negative action. *J Clin Invest.* 1996; 98: 2456-61-77.
- 39- Palmiter KA, Tyska MJ, Haeberle JR, et al. R403Q and L908V mutant-cardiac myosin from patients with familial hypertrophy cardiomyopathy exhibit enhanced mechanical performance at the single molecule level. *J Muscle Res Cell Motil.* 2000; 21: 609-20.
- 40- Ashrafian H, Redwood C, Blair E, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet.* 2003; 19(5): 263-8.
- 41- Dunn RB, High energy phosphate depletion and lactate accumulation in the interventricular septum and left ventricular free wall of the dog after total coronary occlusion. *Circ Res.* 1984; 54: 405-13.
- 42- Crilley JG, Boehm EA, Blair E, et al. Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 21;41(10): 1776-82.
- 43- Watkins H, Ashrafian H, Redwood C, Inherited Cardiomyopathies. *N Engl J Med.* 2011; 28;364(17): 1643-56.
- 44- Nagueh SF, Bachinski LL, Meyer D, et al. Tissue Doppler imaging consistently detects myocardial abnormalities in patients with hypertrophic cardiomyopathy and provides a novel means for an early diagnosis before and independently of hypertrophy. *Circulation.* 2001; 104(2): 128-30.
- 45- Briguori C, Betocchi S, Romano M et al. Exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy depends on left ventricular diastolic function. *Am J Cardiol.* 1999; 84: 309-15.
- 46- Lele SS, Thomson HL, Seo H, et al. Exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy. Role of stroke volume limitation, heart rate, and diastolic filling characteristics. *Circulation.* 1995; 92: 2886-94.
- 47- Hess MO, Mc Kenna W, Schultheiss with co-authors Hullin R, Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Sen-Chowdhry S. Myocardial disease. In Camm JA, Lüscher FT, Serruys WP eds. *The ESC Textbook of cardiovascular medicine.* 1st ed.: Blackwell publishing 2006: 453-515.

- 48- Cannon RO, Rosing DR, Maron BJ, et al. Myocardial ischemia in patients with hypertrophic cardiomyopathy: contribution of inadequate vasodilator reserve and elevated left ventricular filling pressures. *Circulation*. 1985; 71: 234-43.
- 49- Krams R, Kofflard MJ, Duncker DJ, et al. Decreased coronary flow reserve in hypertrophic cardiomyopathy is related to remodeling of the coronary microcirculation. *Circulation*. 1998; 97: 230-3.
- 50- Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, et al. Intramural ("small vessel") coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1986; 8: 545-57.
- 51- Maron BJ, Roberts WC, Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1979; 59: 689-706.
- 52- Cecchi F, Olivotto I, Gistri R, et al. Coronary microvascular dysfunction and prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1027-35.
- 53- Dilsizian V, Bonow RO, Epstein SE, et al. Myocardial ischemia detected by thallium scintigraphy is frequently related to cardiac arrest and syncope in young patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 22: 796-804.
- 54- Maron BJ, The 2009 international hypertrophic cardiomyopathy summit. *Am J Cardiol*. 2010; 105(8): 1164-8.
- 55- Maron BJ, Nishimura RA, Danielson GK, Pitfalls in clinical recognition and a novel operative approach for hypertrophic cardiomyopathy with severe outflow obstruction due to anomalous papillary muscle. *Circulation*. 1998; 98(23): 2505-8.
- 56- Levine RA, Vlahakes GJ, Lefebvre X, et al. Papillary muscle displacement causes systolic anterior motion of the mitral valve. Experimental validation and insights into the mechanism of subaortic obstruction. *Circulation*. 1995; 91(4): 1189-95.
- 57- Sherrid MV, Gunsburg DZ, Moldenhauer S, et al. Systolic anterior motion begins at low left ventricular outflow tract velocity in obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36: 1344-54.

- 58- Sherid MV, Chu CK, Delia E, Mogtader A, Dwyer EM Jr. An echocardiographic study of the fluid mechanics of obstruction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1993; 22: 816-25.
- 59- Maron BJ, Harding AM, Spirito P, et al. Systolic anterior motion of the posterior mitral leaflet: A previously unrecognized cause of dynamic subaortic obstruction. *Circulation.* 1983; 68: 282.
- 60- Ommen SR, Shah MP, Tajik JA, Left ventricular outflow tract obstruction in hypertrophic cardiomyopathy: past, present and future. *Heart.* 2008; 94: 1276-1281.
- 61- Maron MS, Olivotto I, Betocchi S, et al. Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2003; 348: 295.
- 62- Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK et al. American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. A Report of the American College of Cardiology Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42: 1587-713.
- 63- Okeie K, Shimizu M, Yoshio H et al. Left ventricular systolic dysfunction during exercise and dobutamine stress in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36: 856-63.
- 64- Hess MO, Mc Kenna W, Schultheiss with co-authors Hullin R, Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Sen-Chowdhry S. Myocardial disease. In Camm JA, Lüscher FT, Serruys WP eds. *The ESC Textbook of cardiovascular medicine.* 1st ed.: Blackwell publishing 2006: 453-515.
- 65- Lim PO, Morris-Thurgood JA, Frenneaux MP, Vascular mechanisms of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy, including blood pressure responses to exercise. *Cardiol Rev.* 2002; 10: 15-23.
- 66- McKenna WJ, Behr ER. Hypertrophic cardiomyopathy: Management, risk stratification and prevention of sudden death. *Heart.* 2002; 87(2): 169-76.
- 67- Maron BJ, Olivotto I, Bellone P, et al: Clinical profile of stroke in 900 patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39(2): 301-7.

- 68- Adabag AS, Casey SA, Kuskowski MA, et al. Spectrum and prognostic significance of arrhythmias on ambulatory Holter electrocardiogram in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45(5): 697-704.
- 69- Monserrat L, Elliott PM, Gimeno JR, et al. Nonsustained ventricular tachycardia in hypertrophic cardiomyopathy: an independent marker of sudden death risk in young patients. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42: 873-9.
- 70- Wynne J, Braunwald E, Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E: In Braunwald's Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine Seventh Edition. Philadelphia, W.B. Saunders Company. 2008: 1760-74.
- 71- Pasternac A, Noble J, Streulens Y, et al. Pathophysiology of chest pain in patients with cardiomyopathies and normal coronary arteries. *Circulation*. 1982; 65: 778-89.
- 72- Maron BJ, Bonow RO, Cannon RO, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: Interrelation of clinical manifestations, pathophysiology, and therapy. *N Engl J Med*. 1987; 316(14): 844-52.
- 73- Brembilla-Perrot B, Terrier de La Chaise A, Beurrier D. Paroxysmal atrial fibrillation: Main cause of syncope in hypertrophic cardiomyopathy. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1993; 86: 1573-8.
- 74- Frenneaux MP, Counihan PJ, Caforio AL, et al. Abnormal blood pressure response during exercise in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1990; 82: 1995-2002.
- 75- Maron BJ, Epstein SE, Roberts WC. Hypertrophic cardiomyopathy: a common cause of sudden death in the young competitive athlete. *Eur Heart J*. 1983; 135-44.
- 76- Sharma S, Elliott P, Whyte G, et al. Utility of cardiopulmonary exercise in the assessment of clinical determinants of functional capacity in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2000; 86: 162-8.
- 77- Van Driest SL, Ackerman MJ, Ommen SR et al. Prevalence and severity of „benign“ mutations in the beta-myosin heavy chain, cardiac troponin T, and alpha-tropomyosin genes in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2002; 106: 3085-90.
- 78- Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiomyopathy. From mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*. 2001; 104: 557-67.

- 79- Ackerman MJ, Van Driest SL, Ommen SR et al. Prevalence and age-dependence of malignant mutations in the beta-myosin heavy chain and troponin T genes in hypertrophic cardiomyopathy. A comprehensive outpatient perspective. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 2042-8.
- 80- Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1995; 332: 1058-64.
- 81- Charron P, Dubourg O, Desnos M et al. Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene. *Circulation.* 1998; 97: 2230-6.
- 82- Schwartz K, Carrier L, Guicheney P, Komajda M. Molecular basis of familial cardiomyopathies. *Circulation.* 1995; 91: 532-40.
- 83- Thierfelder L, Watkins H, MacRae C et al. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy. A disease of the sarcomere. *Cell.* 1994; 77: 701-12.
- 84- Anan R, Greve G, Thierfelder L et al. Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1994; 93: 280-5
- 85- Coviello DA, Maron BJ, Spirito P et al. Clinical features of hypertrophic cardiomyopathy caused by mutation of a "hot spot" in the alpha-tropomyosin gene. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 29: 635-40.
- 86- Erdmann J, Raible J, Maki-Abadi J et al. Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38: 322-30.
- 87- Gruver EJ, Fatkin D, Dodds GA et al. Familial hypertrophic cardiomyopathy and atrial fibrillation caused by Arg663His beta-cardiac myosin heavy chain mutation. *Am J Cardiol.* 1999; 83: 13H-8H.
- 88- Kimura A, Harada H, Park JE, et al. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 1997; 16: 379-82.

- 89- Marian AJ, Roberts R. Recent advances in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1995; 92: 1336-47.
- 90- Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, et al. Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation*. 2002; 105: 446-51.
- 91- Ho YC, Seidman CE. Genetic mutations that remodel the heart in hypertrophic cardiomyopathy. In: Maron BJ ed. *Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy*, 1st ed. Blackwell Publishing. 2004: 37-66.
- 92- Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, et al. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1992; 326(17): 1108-14.
- 93- Solomon SD, Wolff S, Watkins H, et al. Left ventricular hypertrophy and morphology in familial hypertrophic cardiomyopathy associated with mutations of the beta-myosin heavy chain gene. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 22(2): 498-555.
- 94- Varnova A, Baboonian C, Davison F. A new mutation of the cardiac troponin t gene causing familial hypertrophic cardiomyopathy without LVH. *Heart*. 1999; 82(5): 621-4.
- 95- Carrier L, Hengstenberg C, Beckmann JS, et al. Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to CHM 11. *Nat Genet*. 1993; 4(3): 311-3.
- 96- Bonne G, Carrier L, Richard P, et al. Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res*. 1998; 83: 580-93.
- 97- McKenna WJ, Cocco F, Elliot PM. Gene expression and disease expression in hypertrophic cardiomyopathy.
- 98- Maron BJ, Casey SA, Poliac LC, et al. Clinical course of hypertrophic cardiomyopathy in a regional United States cohort. *JAMA*. 1999; 281: 650-655.
- 99- Olivetto I, Cecchi F, Casey SA, Dolar A, Traverse JH, Maron BJ. Impact of atrial fibrillation on the clinical course of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2001; 104: 2517-24.
- 100- Fay WP, Taliencio CP, Ilstrup DM, et al. Natural history of hypertrophic cardiomyopathy in the elderly. *J Am Coll Cardiol*. 1990; 16: 821-826.

- 101- Shapiro LM, Zezulka A. Hypertrophic cardiomyopathy: a common disease with a good prognosis: five year experience of a district general hospital. *Br Heart J*. 1983; 50: 530-533.
- 102- Braunwald E, Lambrew CT, Rockoff D, et al. Idiopathic hypertrophic subaortic stenosis, I: a description of the disease based upon an analysis of 64 patients. *Circulation*. 1964; 30(Suppl 4): 3-119.
- 103- Yu EH, Omran AS, Wigle ED, et al: Mitral regurgitation in hypertrophic obstructive cardiomyopathy: Relationship to obstruction and relief with myectomy. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36: 2219-25.
- 104- Maron BJ, The electrocardiogram as a diagnostic tool for hypertrophic cardiomyopathy: revisited. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2001; 6: 277-9.
- 105- Sakamoto T. Apical hypertrophic cardiomyopathy (apical hypertrophy): An overview. *J Cardiol*. 2001; 37(Suppl 1): 161-78.
- 106- Runquist LH, Nielsen CD, Killip D, et al. Electrocardiographic findings after alcohol septal ablation therapy for obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2002; 90(9): 1020-2.
- 107- Nagueh SF, Lakkis NM, Middleton KJ, et al. Doppler estimation of left ventricular filling pressures in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1999; 99: 254-61.
- 108- Nagueh SF, Bierig SM, Budoff JM et al. American Society of Echocardiography Clinical Recommendations for Multimodality Cardiovascular Imaging of Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy Endorsed by the American Society of Nuclear Cardiology, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, and Society of Cardiovascular Computed Tomography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2011; 24: 473-98.
- 109- Olszewski R, Timperley J, Szmigielski C, et al. The clinical applications of contrast echocardiography. *Eur J Echocardiogr*. 2007; 8: 13-23.
- 110- Binder J, Attenhofer Jost CH, Klarich KW, et al. Apical Hypertrophic Cardiomyopathy: Prevalence and Correlates of Apical Outpouching. *J Am Soc Echocardiogr*. 2011 Apr 19.
- 111- Kato TS, Noda A, Izawa H, et al. Discrimination of nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy from hypertensive left ventricular hypertrophy on the basis of strain rate imaging by tissue Doppler ultrasonography. *Circulation*. 2004; 110: 3808-14.

- 112- Nishimura RA, Appleton CP, Redfield MM, et al. Noninvasive Doppler echocardiographic evaluation of left ventricular filling pressures in patients with cardiomyopathies: a simultaneous Doppler echocardiographic and cardiac catheterization study. *J Am Coll Cardiol*.1996; 28: 1226-33.
- 113- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005; 18: 1440-63.
- 114- Klues HG, Maron BJ, Dollar AL, et al. Diversity of structural mitral valve alterations in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1992; 85: 1651-60.
- 115- Schwammenthal E, Nakatani S, He S, et al. Mechanism of mitral regurgitation in hypertrophic cardiomyopathy: mismatch of posterior to anterior leaflet length and mobility. *Circulation*.1998; 98: 856-65.
- 116- O'Gara PT, Bonow RO, Maron BJ, et al. Myocardial perfusion abnormalities in patients with hypertrophic cardiomyopathy: assessment with thallium-201 emission computed tomography. *Circulation*. 1987; 76: 1214-23.
- 117- Nagueh SF, Mahmarian JJ, Noninvasive cardiac imaging in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48: 2410-22.
- 118- Camici P, Chiriatti G, Lorenzoni R, et al. Coronary vasodilation is impaired in both hypertrophied and nonhypertrophied myocardium of patients with hypertrophic cardiomyopathy: a study with nitrogen-13 ammonia and positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol*. 1991; 17: 879-86.
- 119- Maron MS, Maron BJ, Harrigan C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy phenotype revisited after 50 years with cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54: 220-8.
- 120- Rickers C, Wilke NM, Jerosch-Herold M, et al. Utility of cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2005; 112: 855-61.

- 121- Maron MS, Hauser TH, Dubrow E, et al. Right ventricular involvement in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2007; 100: 1293-8.
- 122- Harrigan CJ, Appelbaum E, Maron BJ, et al. Significance of papillary muscle abnormalities identified by cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2008; 101: 668-73.
- 123- Petersen SE, Jerosch-Herold M, Hudsmith LE, et al. Evidence for microvascular dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy: new insights from multiparametric magnetic resonance imaging. *Circulation.* 2007; 115: 2418-25.
- 124- Choudhury L, Mahrholdt H, Wagner A, et al. Myocardial scarring in asymptomatic or mildly symptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40: 2156-64.
- 125- Mangalat D, Kalogeropoulos A, Georgiopoulou V, et al. Value of cardiac CT in patients with heart failure. *Curr Cardiovasc Imaging Rep.* 2009; 2: 410-7.
- 126- Alkadhi H, Desbiolles L, Stolzmann P, et al. Mitral annular shape, size, and motion in normals and in patients with cardiomyopathy: evaluation with computed tomography. *Invest Radiol.* 2009; 44: 218-25.
- 127- Chen CC, Lei MH, Hsu YC, et al. Apical hypertrophic cardiomyopathy: correlations between echocardiographic parameters, angiographic left ventricular morphology, and clinical outcomes. *Clin Cardiol.* 2011; 34(4): 233-8.
- 128- Phadk RS, Vaideeswar P, Mittal B, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: an autopsy analysis of 14 cases. *J Postgrad Med.* 2001; 47: 165-70.
- 129- Kaltenbach M, Hopf R, Kober G, et al. Treatment of hypertrophic obstructive cardiomyopathy with verapamil. *Br Heart J.* 1979; 42: 35-42.
- 130- Harrison DC, Braunwald E, Glick G, et al. Effects of beta adrenergic blockade on the circulation with particular reference to observations in patients with hypertrophic subaortic stenosis. *Circulation.* 1964; 29: 84-98.
- 131- Sherrid M, Delia E, Dwyer E. Oral disopyramide therapy for obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1988; 62: 1085-8.

- 132- McDonald K, McWilliams E, O’Keeffe B et al. Functional assessment of patients treated with permanent dual-chamber pacing as a primary treatment for hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 1988; 9: 893-8.
- 133- Yamazaki T, Suzuki J, Shimamoto R, et al. A new therapeutic strategy for hypertrophic nonobstructive cardiomyopathy in humans. A randomized and prospective study with an Angiotensin II receptor blocker. *Int Heart J*. 2007; 48: 715-24.
- 134- Bauersachs J, Stork S, Kung M, et al. HMG CoA reductase inhibition and left ventricular mass in hypertrophic cardiomyopathy: a randomized placebo-controlled pilot study. *Eur J Clin Invest*. 2007; 37: 852-9.
- 135- Sigwart U. Non-surgical myocardial reduction for hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Lancet*. 1995; 346: 211-4.
- 136- Morrow AG, Reitz BA, Epstein SE et al. Operative treatment in hypertrophic subaortic stenosis. Techniques, and the results of pre and postoperative assessments in 83 patients. *Circulation*. 1975; 52: 88-102.
- 137- Berruezo A, Vatasescu R, Mont L, et al. Biventricular pacing in hypertrophic obstructive cardiomyopathy: a pilot study. *Heart Rhythm*. 2011; 8(2): 221-7.
- 138- Maron BJ, Spirito P. Implantable defibrillators and prevention of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2008; 19(10): 1118-26.
- 139- Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. Mikro RNA’lar ve kanser. *Dicle Medical Journal* 2011; 38(1): 113-120.
- 140- Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor. *Cancer Metastasis Rev*. 2009; 28: 369-378.
- 141- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-854.
- 142- Ruvkun G, Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 2001; 294: 797-799.
- 143- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-906.

- 144- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408: 86-89.
- 145- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-858.
- 146- Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y, The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci* 2010; 101: 2309-2315.
- 147- Lee Y, Ahn C, Han J. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419.
- 148- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269.
- 149- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-98.
- 150- Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J.* 2002; 21: 5875-5885.
- 151- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-366.
- 152- Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 2005; 123: 631-640.
- 153- Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S, microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng* 2010; 12: 1-27.
- 154- Pillai RS, MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA. *RNA* 2005; 11: 1753-1761.
- 155- He L and Hannon GJ, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004; 5(7): 522-31
- 156- Chen JF, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 211-216.

- 157- Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes & Development*. 2008; 22: 3242–3254.
- 158- Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1–2. *Cell*. 2007; 129: 303–317.
- 159- van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 18255–18260.
- 160- Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*. 2005; 436: 214–220.
- 161- van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007; 316: 575–579.
- 162- Morton SU, Scherz PJ, Cordes KR, Ivey KN, Stainier DY, Srivastava D, MicroRNA-138 modulates cardiac patterning during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 17830–17835.
- 163- Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N: Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 2009; 55: 1944-9.
- 164- Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen J, Heymans S, Schroen B: Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3: 499-506.
- 165- Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, Wang L, Li Q, Wang N, Shan H, Li Z, Yang B: Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 391: 73-7.
- 166- Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, van der Made I, Herias V, van Leeuwen RE, Schellings MW, Barenbrug P, Maessen JG, Heymans S, Pinto YM, Creemers EE, miR-133 and miR-30 Regulate Connective Tissue Growth Factor. Implications for a Role of MicroRNAs in Myocardial Matrix Remodeling. *Circ Res* 2009; 104: XXX–XXX

- 167- Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008; 456(7224): 980–984.
- 168- Busk PK, Cirera S, MicroRNA profiling in early hypertrophic growth of the left ventricle in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 11: 396(4): 989-93.
- 169- Xu, C., Lu, Y., Pan, Z., Chu, W., Luo, X., Lin, H., Xiao, J., Shan, H., Wang, Z., and Yang, B, The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J. Cell. Sci*. 2007; 120: 3045–3052.
- 170- Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008; 54: 482–490.
- 171- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008; 141: 672–675.
- 172- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* 2008; 18: 997-1006.
- 173- Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ, et al. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 394: 184–188.
- 174- D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010; 31: 2765-2773.
- 175- Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of Plasma miRNAs in Congestive Heart Failure. *Circ J*. 2011; 75: 336–340.
- 176- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 10513–10518.

- 177- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. PLoS ONE 2008; 3: e3148.
- 178- Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nat Cell Biol 2008; 10: 1470–1476.
- 179- Hunter MP, İsmail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. PLoS ONE 2008; 3: pe3694.
- 180- Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12- dependent vascular protection. Sci Signal. 2009; 2: ra81.
- 181- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proc Natl Acad Sci USA. 2011; 108: 5003-5008.
- 182- Maron BJ, Gardin JM, Flack JM et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults: Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study. Circulation. 1995; 92: 785–9.
- 183- Klues HG, Schiffrers A, Maron BJ. Phenotypic spectrum and patterns left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. Morphologic observations and significance as assessed by two-dimensional echocardiography in 600 patients. J Am Coll Cardiol. 1995; 26: 699-708.
- 184- Safar ME, Lehner JP, Vincent MI, Plainfosse MT, Simon AC, Echocardiographic dimensions in borderline and sustained hypertension Am J Cardiol. 1979; 44(5): 930-5.
- 185- Feigenbaum H, Amstrong FW, Ryan T. Evaluation of systolic and diastolic function of the left ventricle, Feigenbaum's echocardiography, 6th edition, Philadelphia, Lipincott Williams&Wilkin. 2005: 138-180.
- 186- Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass. Anatomic validation of the method. Circulation. 1997; 55(4): 613-618.

- 187- Klues HG, Roberts WC, Maron BJ. Morphological determinants of echocardiographic patterns of mitral valve systolic anterior motion in obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1993; 87: 1570-9.
- 188- Steer CJ, Subramanian S. Circulating MicroRNAs as Biomarkers: A New Frontier in Diagnostics. *Liver Transpl*. 2012; 18: 265-269.
- 189- Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev* 2011; 91: 827-887.
- 190- Cortez MA, Calin GA, MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2009; 9: 703-711.
- 191- Schöler N, Langer C, Döhner H, Buske C, Kuchenbauer F. Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. *Exp Hematol* 2010; 38: 1126-1130.
- 192- Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res* 2011; 717: 85-90.
- 193- Roncarati R, Anselmi CV, Losi MA, Papa L, Cavarretta E, Costa Martins PD, Jotti GS, Franzone A, Galastri L, Latronico MV, Imbriaco M, Esposito G, De Windt L, Betocchi S, Condorelli G, Circulating miR-29a, Among Other Upregulated microRNAs, is the Only Biomarker for Both Hypertrophy and Fibrosis in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 0735-1097(13)05589-7.
- 194- Li Q, Song XW, Zou J, Wang GK, Kremneva E, Li XQ, Zhu N, Sun T, Lappalainen P, Yuan WJ, Qin YW, Jing Q, Attenuation of microRNA-1 derepresses the cytoskeleton regulatory protein twistin-1 to provoke cardiac hypertrophy. *J Cell Sci*. 2010; 123(Pt 14): 2444-52.
- 195- van Rooij E, Liu N and Olson EN, MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet*. 2008; 24: 159-166.
- 196- Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ and Srivastava D, Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*. 2007; 129: 303-317.

- 197- Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, et al. MicroRNA-133 controls cardiachypertrophy. *Nat. Med.* 2007; 13: 613-618.
- 198- Ikeda S, He A, Kong SW, Lu J, Bejar R, Bodyak N, Lee KH, Ma Q, Kang PM, Golub TR et al. MicroRNA-1 negatively regulates expression of thehypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol. Cell. Biol.* 2009; 29: 2193-2204.
- 199- Luo X, Lin H, Pan Z, Xiao J, Zhang Y, Lu Y, Yang B and Wang Z, Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 20045-20052.
- 200- Zhang Y, Sun L, Zhang Y, Liang H, Li X, Cai R, Wang L, Du W, Zhang R, Li J, Wang Z, Ma N, Wang X, Du Z, Yang B, Gao X, Overexpression of microRNA-1 causes atrioventricular block in rodents. *Shan HInt J Biol Sci.* 2013; 9(5): 455-62.
- 201- Tatsuguchi M, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(6): 1137–1141.
- 202- Patrick DM, Montgomery RL, Qi X, Obad S, Kauppinen S, Hill JA, van Rooij E, Olson EN. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in miceJ *Clin Invest.* 2010; 120(11): 3912-6.
- 203- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ, The role of microRNA-1 and microR-NA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 2006; 38: 228–233.
- 204- Xiong J, Du Q, Liang Z. Tumor-suppressive microRNA-22 inhibits the transcription of E-boxcontaining c-Myc target genes by silencing c-Myc binding protein. *Oncogene.* 2010; 29: 4980– 4988.
- 205- Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, Kudo Y, Tamaki A, Matsunaga J, Takahashi RU, TakataT, Shimamoto A, Ochiya T, Tahara H. miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011; 193: 409–424.
- 206- Gurha P, Abreu-Goodger C, Wang T, et al. Targeted deletion of microR-NA-22 promotes stressinduced cardiac dilation and contractile dysfunction. *Circulation.* 2012; 125: 2751–2761.

- 207- Huang ZP, Chen J, Seok HY, Zhang Z, Kataoka M, Hu X, Wang DZ, MicroRNA-22 Regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circ Res.* 2013; 112(9): 1234-43.
- 208- Goonasekera SA, Hammer K, Auger-Messier M, et al. Decreased cardiac L-type Ca²⁺ channel activity induces hypertrophy and heart failure in mice. *J Clin Invest.* 2012; 122: 280–290.
- 209- Thum T, et al. MicroRNAs in the human heart: A clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation.* 2007; 116: 258–267.
- 210- Lin Z, Murtaza I, Wang K, Jiao J, Gao J, Li PF, miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(29): 12103-8.
- 211- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A, Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 2003; 17: 2205–2232.
- 212- Wilkins BJ, Molkentin JD, Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 1178–1191.
- 213- Willis MS, et al. Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo. *Circ Res.* 2007; 100: 456–459.
- 214- Wang K, Lin ZQ, Long B, Li JH, Zhou J, Li PF, Cardiac hypertrophy is positively regulated by MicroRNA miR-23a. *J Biol Chem.* 2012; 287(1): 589-99.
- 215- Sucharov CC, et al. A beta1-adrenergic receptor CaM kinase II-dependent, 2006; 291: 1299-1308.
- 216- Sadoshima J, Izumo S, Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res.* 1993; 73: 413–423.
- 217- Rajamannan NM, et al. TGFbeta inducible early gene-1 (TIEG1) and cardiac hypertrophy: Discovery and characterization of a novel signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2007; 100: 315–325.
- 218- Suárez Y, Fernández-Hernando CJ, New insights into microRNA-29 regulation: A new key player in cardiovascular disease. *Mol Cell Cardiol.* 2012; 52(3): 584-6.

- 219- Boon RA, Seeger T, Heydt S, Fischer A, Hergenreider E, Horrevoets AJ, et al. Micro-RNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. *Circ Res*. Oct 28, 2011; 109(10): 1115-9.
- 220- Yin X, Peng C, Ning W, Li C, Ren Z, Zhang J, Gao H, Zhao K. miR-30a downregulation aggravates pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy *Mol Cell Biochem*. 2013; 379(1-2): 1-6.
- 221- Zhao DS, Chen Y, Jiang H, Lu JP, Zhang G, Geng J, Zhang Q, Shen JH, Zhou X, Zhu W, Shan QJ, Serum miR-210 and miR-30a expressions tend to revert to fetal levels in Chinese adult patients with chronic heart failure. *Cardiovasc Pathol*. 2013 May 6.
- 222- Long G, Wang F, Duan Q, Yang S, Chen F, Gong W, Yang X, Wang Y, Chen C, Wang DW, Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b Associated with Acute Myocardial Infarction *PLoS One*. 2012; 7(12): e50926.
- 223- Emanuelli C, Thum T, miR-34 induces cardiac damage. *Cell Res*. 2013; 23(7): 866.
- 224- Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, Kaluza D, Tréguer K, Carmona G, Bonauer A, Horrevoets AJ, Didier N, Girmatsion Z, Biliczki P, Ehrlich JR, Katus HA, Müller OJ, Potente M, Zeiher AM, Hermeking H, Dimmeler S. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature*. 2013; 495(7439): 107-10.
- 225- Bernardo BC, Gao XM, Winbanks CE, Boey EJ, Tham YK, Kiriazis H, Gregorevic P, Obadi S, Kauppinen S, Du XJ, Lin RC, McMullen JR. Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(43): 17615-20.
- 226- Matkovich SJ, Wang W, Tu Y, Eschenbacher WH, Dorn LE, Condorelli G, Diwan A, Nerbonne JM, Dorn GW 2nd. MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts. *Circ Res* 2010; 106: 166–175.
- 227- Li Q, Lin X, Yang X, Chang J. NFATc4 is negatively regulated in miR-133a-mediated cardiomyocyte hypertrophic repression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298(5): 1340-7.

- 228- Liu J, Hao DD, Zhang JS, Zhu YC. Hydrogen sulphide inhibits cardiomyocyte hypertrophy by up-regulating miR-133a *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 413(2): 342-7.
- 229- Wang F, Long G, Zhao C, Li H, Chaugai S, Wang Y, Chen C, Wang DW, Plasma microRNA-133a is a new marker for both acute myocardial infarction and underlying coronary artery stenosis. *J Transl Med*. 2013; 11(1): 222.
- 230- Song XW, Li Q, Lin L, Wang XC, Li DF, Wang GK, Ren AJ, Wang YR, Qin YW, Yuan WJ, Jing Q, MicroRNAs are dynamically regulated in hypertrophic hearts, and miR-199a is essential for the maintenance of cell size in cardiomyocytes. *J Cell Physiol*. 2010; 225(2): 437-43.
- 231- Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K, Kayama Y, Harada M, Shimizu I, Asahara T, Hamada H, Tomita S, Molkentin JD, Zou Y, Komuro I. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*. 2007; 446: 444–448
- 232- Baumgarten A, Bang C, Tschirner A, Engelmann A, Adams V, von Haehling S, Doehner W, Pregla R, Anker MS, Blecharz K, Meyer R, Hetzer R, Anker SD, Thum T, Springer J, TWIST1 regulates the activity of ubiquitin proteasome system via the miR-199/214 cluster in human end-stage dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2013; 5273(13)00005-3.