



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KORONER ARTER HASTALIĞI NEDENİYLE KORONER BYPASS
AMELİYATI OLAN HASTALARIN PERİKARDİYAL SIVISINDAKİ
MİKRORNA'LARIN ve ST2'NİN (GROWTH STIMULATION EXPRESSED
GENE 2) ARAŞTIRILMASI**

Reşat DİKME
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora Programı)

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Feridun AKKAFA

Gaziantep
2018

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

**KORONER ARTER HASTALIĞI NEDENİYLE KORONER BYPASS
AMELİYATI OLAN HASTALARIN PERİKARDİYAL SIVISINDAKİ
MİKRORNA'LARIN ve ST2'NİN (GROWTH STIMULATION EXPRESSED
GENE 2) ARAŞTIRILMASI**

Reşat DİKME

Tez Savunma Tarihi: 08.06.2018
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

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

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Feridun AKKAFA

İkinci Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Tez Danışmanı

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

Tez Jürisi

İmza

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Prof. Dr. Mehtap ÖZKUR

Doç. Dr. Halit AKBAŞ

Dr. Öğr. Ü. Abu Shameem Md. SAADAT KHANDAKAR

Dr. Öğr. Ü. İsmail KOYUNCU

BEYAN

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

08.06.2018

Reşat DİKME

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bilgi, tecrübe, destek ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Tez Danışman hocam olan Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI'ya;

Doktora eğitimi ve Tez çalışmam süresince katkı ve yardımlarını esirgemeyen aynı zamanda ikinci danışman hocam Doç. Dr. Feridun AKKAFA'ya;

Doktora eğitimi süresince arkadaşlık, samimiyet ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Ü. Abu Shameem Md. SAADAT KHANDAKAR'a;

Tez çalışmam süresince malzeme temini ve laboratuvar çalışmasında sınırsız destek veren aynı zamanda görev yaptığım yer olan SHMYO'nun müdürü Dr. Öğr. Ü. İsmail KOYUNCU'ya;

Tez çalışmasının yürütülmesi sırasında gerek malzeme gerekse çalışma açısından katkı ve yardımlarını esirgemeyen aynı zamanda sınıf ve mesai arkadaşım Öğr. Gör. Ebru TEMİZ ile Doktora eğitimimde katkı ve yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Hasan DAĞLI, Uzm. Demet TAŞDEMİR ve Tıbbi Biyoloji AD personeline;

Doktora süresince problemlere yaklaşım ve çözüm yollarıyla ufkumu açan, tez çalışmamda destek olan Prof. Dr. Mustafa GÖZ ve Doç. Dr. M. Salih AYDIN'a;

Doktora eğitimine beraber başladığımız, laboratuvar da beraber çalıştığımız, değerli sınıf arkadaşlarım Öğr. Gör. Hamza Malik OKUYAN ve Meltem KORUK'a; Hasta numunelerini toplamada yardımcı olan Perfüzyonist Gafure ARSLAN, Yasemin HACANLI ve Uzm. Perfüzyonist Ezhar ERSÖZ'e;

İyi ve kötü günlerde beraber olduğumuz arkadaşlarım Abdullah TAŞKIN, Mahmut PADAK ve Ömer GÖÇ'e;

Geçmişte eğitimime katkı veren değerli öğretmen ve hocalarıma;

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalındaki tüm çalışan ve öğrenci olan arkadaşlarıma;

Sağlık Bilimleri Enstitü Sekreteri Eşref Şefik ERCAN başta olmak üzere tüm enstitü çalışanlarına;

Hak ettiği zamanı kendilerine ayıramadığım güzel kızlarım Zeynep Erva ve Zümra ile değerli eşim Tuğba'ya;

Bugünlere gelmeme vesile olan, beni yetiştirip büyüten ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından 17010 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
SİMGE VE KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Koroner Arter Hastalığı	6
2.1.1. Koroner arter hastalığının prevalansı.....	7
2.1.2. Koroner arter hastalığında genel risk faktörleri	7
2.1.3. Akut koroner sendrom ve miyokard infarktüsü	8
2.1.4. Koroner arter hastalığında semptomlar / klinik özellikler	8
2.1.5. Koroner arter hastalığında teşhis	9
2.1.6. Koroner arter hastalığında patofizyolojik mekanizmalar.....	10
2.1.6.1. Hücresel seviyedeki mekanizma.....	10
2.1.6.2. Anatomik düzeydeki mekanizma.....	11
2.1.6.3. Ateroskleroz patogenezi- koroner arter kalsifikasyonu	11
2.1.7. Normal damarın endotel yapısı ve fonksiyonları	12
2.1.8. Endotel disfonksiyonu	13
2.1.9. Ateroskleroz için risk faktörleri	13
2.1.9.1. Yaş ve cinsiyet.....	14
2.1.9.2. Sigara	14
2.1.9.3. Lipidlerin rolü	14
2.1.9.4. Metabolik sendrom	15
2.1.9.5. Diyabet ve insülin direnci	15
2.1.9.6. Hipertansiyon.....	15
2.1.9.7. Ailesel yatkınlık-genetik değerlendirme.....	15
2.1.10. Koroner arter hastalığında toplam riskin hesaplanması	16
2.1.11. Koroner arter hastalığında yeni risk faktörleri.....	16
2.1.12. Koroner arter hastalığında tedavi prensipleri.....	16
2.2. Perkütan Koroner Girişim, Koroner Arter Bypass Greft ve Kardiyopulmoner Bypass	17

2.3. Perikardın Anatomisi ve Histolojisi.....	18
2.3.1. Perikardiyal sinüsler ve sınırlar	20
2.3.2. Perikardın gelişmesi.....	21
2.3.3. Perikardiyal boşluk, perikardiyal sıvı ve içeriği	21
2.3.4. Perikardın ve perikardiyal sıvının önemli fonksiyonları ile fizyolojisi	22
2.3.5. Hastalık halinde perikardın değişimleri	24
2.3.6. Perikardiyal hidrokinamik ve lenf drenajı	25
2.3.7. Perikardiyal basınç.....	26
2.3.8. Perikardiyal efüzyon	26
2.3.9. Kalp tamponadı.....	27
2.3.10. Perikardiyal sıvıda yapılan incelemeler	27
2.3.10.1. Perikardiyosentez.....	27
2.3.11. Perikard tedavilerinin geleceği	28
2.4. mikroRNA'lar (miRNA)	28
2.4.1. miRNA oluşumu ve işlenmesi	29
2.4.2. Çalışmada kullanılan miRNA'ların (miR-125b-5p, miR-320b, miR-34a-5p, miR-16-5p, miR-320a ve miR-15a-5p) seçilme nedenleri.....	36
2.4.2.1. miR-320b	37
2.4.2.2. miR-34a-5p	37
2.4.2.3. miR-125b-5p.....	38
2.4.2.4. miR-16-5p.....	39
2.4.2.5. miR-320a	39
2.4.2.6. miR-15a-5p	40
2.5. ST2 (Growth Stimulation Expressed Gene 2- İnterleukin 1 Receptor Like 1 (IL1RL1))	40
3. GEREÇ ve YÖNTEM	48
3.1. Çalışma Yapılan Hastalar	48
3.2. Perikardiyal Sıvının Eldesi	48
3.3. Kan Plazmasının Eldesi	49
3.4. PS ve Plazmada ST2 Gen İfade Çalışma Aşamaları	49
3.4.1. ST2 gen ifade düzeyi için PS ve plazmada total RNA (mRNA) izolasyonu	49
3.4.2. ST2 gen ifade düzeyi için PS ve plazmada mRNA'dan cDNA eldesi.....	50
3.4.3. ST2 gen ifade düzeyi için PS ve plazmada elde edilen cDNA'lardan kalite ve miktar tayini	51

3.4.4. ST2 gen ifade düzeyi için PS ve plazmada mRNA- cDNA preamplifikasyonu (preAmp).....	51
3.4.5. PS ve plazmada ST2 gen ifade düzeyi için PCR protokolü.....	52
3.4.6. PS ve plazmada ST2 gen ifade düzeyi için real-time PCR (qRT-PCR) yöntemi	52
3.4.7. PS ve plazmada ST2 ifade düzeyi için primer seçimi.....	53
3.5. PS ve Plazmada miRNA İfadesi Çalışma Aşamaları.....	54
3.5.1. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için mikroRNA izolasyonu	54
3.5.2. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için miRNA'dan cDNA eldesi	55
3.5.3. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için elde edilen cDNA'lardan kalite ve miktar tayini	56
3.5.4. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için miRNA'dan cDNA –preAmp (preamplifikasyon) aşaması	56
3.5.5. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için PCR protokolü.....	57
3.5.6. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için qRT-PCR (real time-PCR, eş zamanlı-PCR).....	57
3.5.7. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için miRNA primer seçimi	58
3.6. PS ve Plazmada ST2 İçin ELİSA Çalışması.....	58
3.6.1. PS ve plazmada ST2 için ELİSA çalışmasında standart hazırlama	59
3.6.2. PS ve plazmada ST2 için ELİSA çalışmasında seri dilüsyon yöntemi ile standartlar hazırlama	59
3.6.3. PS ve plazmada ST2 için ELİSA çalışmasında biyotinlenmiş deteksiyon çalışma solüsyonu hazırlama.....	59
3.6.4. PS ve plazmada ST2 için ELİSA çalışmasında konsantreHRP konjugat çalışma solüsyonu hazırlama.....	59
3.6.5. PS ve plazmada ST2 için ELİSA çalışmasında kitin çalışma prosedürü	59
3.7. İstatistiksel Analiz	60
3.8. Qiagen İstatistiksel Analiz.....	61
4. BULGULAR	62
4.1. Çalışma Grubu Sonuçları.....	62
4.2. PS ve Plazmada sST2 Eliza Sonuçları.....	63
4.3. PS ve Plazmada ST2 Gen İfade Sonuçları.....	64
4.4. PS ve Plazmada miRNA Gen İfade Sonuçları.....	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	75
6. KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ	103

SİMGE VE KISALTMALAR

ACC:	American Collage of Cardiology
ACT:	Activated Clotting Time
AHA:	American Heart Association
CABG:	Coronary Artery Bypass Graft
cDNA:	Complementary DNA
CPB:	Cardiopulmonary Bypass
CVP:	Santral Venöz Basınç
GOI:	Gene Of Interest
HF:	Heart Failure
HKG:	Housekeeping Genes
HR:	Kalp Hızı
ICAM-1:	Hücre İçi Adezyon Molekülü-1
IL-1β:	İnterlökin-1 β
İTA:	İnternal Torasik Arter
KABG:	Koroner Arter Bypass Greftleme
KPB:	Kardiyopulmoner Bypass
LAD:	Sol Anterior İnen Dal
lncRNA:	Long Non-Coding RNA
MAP:	Ortalama Arter Basıncı
MI:	Miyokard İnfarktüsü
miRNA:	Mikro Ribonükleik Asit
mRNA:	Mesajcı RNA
ncRNA:	Non-Coding RNA
NO:	Nitrik Oksit
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCWP:	Pulmoner Kapiller Wedge Basıncı
PTCA:	Percutaneous Transluminal Coronar Angioplasty
qRT-PCR:	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RISC:	RNA-İnduced Silencing Complex
RT-PCR:	Reverse Transkriptaz PCR
SIRS:	Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu
siRNA:	Small İnterfering RNA

ST2: Growth Stimulation Expressed Gene 2-İnterleukin 1 Receptore Like1 İnterleukin (IL1RL1)

TEKHARF: Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri

TLR: Toll-Like Reseptörler

TNF- α : Tümör Nekroz Faktör- α

VCAM-1: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. AKS gelişimi	11
Şekil 2.2. Perikard anatomisi	19
Şekil 2.3. Perikardiyum tabakaları	20
Şekil 2.4. Transvers ve oblik perikardiyal sinüsler	21
Şekil 2.5. miRNA oluşum aşamaları	31
Şekil 2.6. miRNA oluşum yolları	32
Şekil 2.7. miRNA'ların yıllara göre gelişerek tespit edilme süreçleri.....	34
Şekil 2.8. Metabolizmada etkili olan bazı miRNA'lar	35
Şekil 2.9. miR-320b ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi.....	38
Şekil 2.10. miR-34a-5p ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi .	38
Şekil 2.11. miR-34a-5p'nin KAH ile ilişkisi	38
Şekil 2.12. miR-125b-5p ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi.....	39
Şekil 2.13. miR-16-5p ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi ...	39
Şekil 2.14. miR-320a ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi.....	40
Şekil 2.15. miR-15a-5p ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi .	40
Şekil 2.16. Interlökin-33/ST2L sinyali ile aktive olan hücre içi yolları	43
Şekil 2.17. sST2'nin serum/plazma konsantrasyon çalışmaları	45
Şekil 4.1. sST2 standart doğrulama grafiği	63
Şekil 4.2. PS ve Plazmada sST2 ELİSA sonuçlarının ng/ml cinsinden ortalama değerleri	64
Şekil 4.3. sST2 qRT-PCR döngü değerleri.....	64
Şekil 4.4. PS ve Plazmada sST2 ortalama Ct değerleri	66
Şekil 4.5. PS ve Plazmada sST2 ortalama Delta Ct değerleri	67
Şekil 4.6. PS ve Plazmada sST2'nin ortalama $2^{(-\text{Ort. Delta Ct})}$ değerleri.....	67
Şekil 4.7. PS ve Plazmada sST2'nin kat değişim değerleri.....	68
Şekil 4.8. miRNA qRT-PCR döngü değerleri	68
Şekil 4.9. PS ve Plazmadaki miRNA'ların Ort. (AVG) Ct değerleri	70
Şekil 4.10. PS ve Plazmada miRNA'ların Ort. (AVG) Delta Ct değerleri.....	71
Şekil 4.11. PS ve Plazmada miRNA'ların $2^{(-\text{Ort. Delta Ct})}$ değerleri.....	71
Şekil 4.12. Plazmanın PS ile kıyaslanması sonucunda plazmadaki miRNA'lar için elde edilen kat değişim sonuçları	72

Şekil 4.13. PS ve Plazmadaki miRNA'ların Heatmap grafiği.....	74
--	----



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Farklı türlerde tanımlanmış Mirtron tipleri.....	33
Tablo 3.1. mRNA'dan cDNA eldesi için Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımı	50
Tablo 3.2. mRNA'dan cDNA eldesi için reaksiyon karışımı	51
Tablo 3.3. ST2 ifade düzeyi için primer pool karışımı	51
Tablo 3.4. ST2 ifade düzeyi için rutin PCR protokolü	52
Tablo 3.5. ST2 ifade düzeyi için qRT-PCR bileşenleri	53
Tablo 3.6. ST2 için eş zamanlı PCR ayarları	53
Tablo 3.7. ST2 ve Beta Actin forward ile reverse pirmerleri.....	53
Tablo 3.8. miRNA'dan cDNA eldesi için bileşenler ve miktarları tablosu	56
Tablo 3.9. miRNA'dan cDNA preAmp aşaması primer pool içerikleri	56
Tablo 3.10. miRNA'dan cDNA eldesi için rutin PCR protokolü	57
Tablo 3.11. miRNA ifade düzeyleri için qRT-PCR bileşenlerin oranları.....	57
Tablo 3.12. miRNA ifade düzeyleri için qRT-PCR tepkime koşulları	58
Tablo 3.13. hsa miScript Primer Assaylerin 5' ve ticari katalog numaraları	58
Tablo 4.1. Çalışmaya alınan hastalara ait demografik özellikler	62
Tablo 4.2. PS ve plazmada sST2 ve miRNA'lara ait ELİSA ve gen ekspresyon sonuçları.....	62
Tablo 4.3. PS ve Plazmada herbir numuneye ait ST2 Ct değerleri.....	65
Tablo 4.4. PS ve Plazmadaki sST2'nin gen ifadesinin istatistiksel sonuçları.....	65
Tablo 4.5. PS ve Plazmada herbir numuneye ait 6 miRNA'nın Ct değerleri	69
Tablo 4.6. PS ve Plazmadaki 6 miRNA'ya ait gen ifadesinin istatistiksel sonuçları.....	70

ÖZET

KORONER ARTER HASTALIĞI NEDENİYLE KORONER BYPASS AMELİYATI OLAN HASTALARIN PERİKARDİYAL SIVISINDAKİ MİKRORNA'LARIN ve ST2'NİN (GROWTH STIMULATION EXPRESSED GENE 2) ARAŞTIRILMASI

Reşat DİKME

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI, Doç. Dr. Feridun AKKAFA

08.06.2018, 115 Sayfa

Koroner arter hastalığıyla (KAH) ilişkili bir çok biyobelirteç perikard sıvısına (PS) ve plazmaya geçmektedir. KAH'ın etiopatogenez değerlendirilmesinde diagnostik olarak miRNA'lar, prognostik olarak soluble ST2 (sST2) kullanılabilmektedir. sST2 kardiyovasküler hastalığı olan bireylerde kötüleşen prognozun bir biyobelirteci olarak kabul edilmektedir. Birçok hastalıkta önemli rollere sahip olan miRNA'lar ise KAH ile ilişkili endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, inflamasyon, apoptoz ve anjiyogeneizde etkindir. PS kalp fonksiyonunu yansıtabilme potansiyeline sahip olup bazı maddelerin PS konsantrasyonları birçok patofizyolojik mekanizmaların anlaşılmasını sağlamaktadır.

Çalışmamıza koroner arter bypass ameliyatı olan 40 gönüllü hasta dâhil edilerek PS ve kan plazmasında ELİSA yöntemi ile ST2 seviyesi, qRT-PCR yöntemi ile ST2 ve ST2'yi hedefleyen bir grup miRNA'nın (miR-125b-5p, miR-320b, miR-34a-5p, miR-16-5p, miR-320a ve miR-15a-5p) gen ifade düzeyleri çalışıldı.

Araştırmada ELİSA ile ortalama sST2 değeri PS'de 223.992 ng/ml, Plazmada ise 390.357 ng/ml olup bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0020$). PS'de ST2 gen ifade düzeyi Plazmaya göre 2.27 kat daha düşük çıkmış olup bu durum istatistiksel açıdan anlamlı ($p=0.000265$) bulunmuştur. ST2'yi hedefleyen miRNA'ların gen ifadesinde PS'de 7.35 kat daha düşük ifade edilen miR16-5p ile 4.07 kat daha düşük ifade edilen miR320b istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p=0.000014$ ve $p=0.00814$). Plazmada ise miR34a-5p ile ST2 arasında negatif korelasyon bulunmuştur ($r=-0.399$, $p=0.039$).

ST2'nin protein düzeyi ve gen ifadesi ile miR 16-5p ve miR 320b'nin gen ifade düzeyinin PS'ye göre plazmada daha yüksek çıkmasının sebebi ekstramiyokardiyal kaynaklar olabilir. Kardiyovasküler hastalıklar açısından olumsuz etkiye sahip olan miR 16-5p ve miR 320b'nin ST2 ile beraber yüksek seviyelerde bulunması ve plazmada daha fazla ifade edilmesi bunların biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelini kuvvetlendirmektedir. Daha önce başka çalışmalarda sadece PS'ye özgü olarak tanımlanan miR320b'nin ayrıca plazmada da tespit edilmesi bu miRNA'nın sadece PS'ye özgü olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Koroner arter hastalığı, Perikardiyal sıvı, mikroRNA, ST2, IL1RL1.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MICRORNA'S AND ST2 (GROWTH STIMULATION EXPRESSED GENE 2) IN PERICARDIAL FLUID OF PATIENTS UNDERGOING CORONARY ARTERY BYPASS SURGERY DUE TO CORONARY ARTERY DISEASE

Reşat DİKME

Doctoral Thesis, Department of Medical Biology

Thesis Advisor: Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI, Assoc. Prof. Dr. Feridun AKKAFA

08.06.2018, 115 Pages

Many biomarkers related to coronary artery disease (CAD) are transmitted to pericardial fluid (PF) and plasma. In the etiopathogenesis evaluation of CAD, miRNAs can be used diagnostically and soluble ST2 (sST2) can be used prognostically. sST2 is accepted as a biomarker of the ingravescient prognosis in individuals with cardiovascular disease. miRNAs, which play important role in many diseases, are efficient in CAD related endothelial dysfunction, atherosclerosis, inflammation, apoptosis and angiogenesis. PS has potency to reflect cardiac function, and PF concentrations of some substances help to understand many pathophysiological mechanisms.

40 patients having undergone coronary artery bypass operation were included in the study, and gene expression level of group miRNAs (miR-125b-5p, miR-320b, miR-34a-5p, miR-16-5p, miR-320a and miR-15a-5p) targeting ST2 level with ELISA method and ST2 and ST2 with qRT-PCR method within PF and blood were studied.

In our study, mean sST2 value with ELISA was 223.992 ng/ml in PF and 390,357 ng/ml in Plasma, which was found statistically significant ($p = 0.0020$). The ST2 gene expression level in PF was 2.27 times lower compared to its level in Plasma and this situation was found statistically significant ($p = 0.000265$). miR16-5p which is said to be 7.35 times lower in PF and miR320b said to be 4.07 times lower were found to be statistically significant within gene expression of miRNAs targeting ST2 ($p = 0.000014$ and $p = 0.00814$, respectively). In plasma, negative correlation was found between miR34a-5p and ST2 ($r = -0.399$, $p = 0.039$).

The reason why protein levels and gene expression of ST2 and gene expression level of miR 16-5p and miR 320b are higher in plasma may be caused by extramyocardial sources. Higher levels of miR 16-5p and miR 320b together with ST2, which have an adverse effect in terms of cardiovascular diseases, and their more frequent expressions in the plasma strengthen their potential to be used as biomarkers. The fact that miR320b, defined as specific to PF in other studies, was also found in plasma, reveals that this miRNA is not only specific to PF.

Key words: Coronary artery disease, Pericardial fluid, microRNA, ST2, IL1RL1.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Koroner arter hastalığı (KAH) tüm dünyadaki mortalite ve morbiditenin önemli sebeplerinden biri olup, görülme insidansı hızla artmaktadır. Kardiyovasküler hastalıkların (KVH) tedavisinde devam eden gelişmelere rağmen bu hastalıklar ölüm nedeni olarak halen birinci sırada yer almaktadır (1). Yapılan çalışmalar ile 2020 yılına kadar KVH'a bağlı mortalitenin % 28,9'dan % 36,3'e yükseleceği tahmin edilmektedir (2). Dünya Sağlık Örgütü KAH'ye bağlı ölümlerin önümüzdeki yirmi yılda kadınlarda % 120 erkeklerde % 137 artacağını öngörmektedir. ABD'de tüm yatan hastaların tedavi giderlerinin dörtte birini 71,2 milyar dolarla KAH oluşturduğu için hastalığın tedavisi ve önlenmesi için moleküler patogenezin anlaşılması, yeni biyobelirteçlerin (biyomarker) ortaya çıkması ve hastalığı önleyici maddelerin tanımlanıp kullanılması gerekir (3).

Son dönemlerde yapılan araştırmalarda KAH oluşmasında veya engellenmesinde mikroRNA'ların (miRNA-miR) ve ST2'nin (Growth stimulation expressed gene 2, İnterleukin 1 receptor like 1, IL1RL1) direkt veya dolaylı yollar ile etkili olduğu belirlenmiştir (4, 5, 6, 7).

KVH'ta teşhis için kanın yanı sıra perikardiyal sıvı (PS)'da kullanılabilmektedir. Kalbin tamamını saran ve çift duvarlı kese olan perikard boşluğu içindeki sıvı olan PS dinamik değişiklikler göstermektedir. Perikard immünolojik, parakrin, vazomotor ve fibrinolitik aktiviteye de sahip olup; eikozanoidler ve prostoglandin gibi maddeler sentezleyerek miyosit yapısını, fonksiyonunu ve gen ifadesini etkilemektedir (8). PS analizi; çeşitli perikardiyal ve kardiyovasküler hastalıklarda birçok patofizyolojik mekanizmaların anlaşılmasını sağlamaktadır.

Miyokard dokusunda kardiyomiyosit ve fibroblastlardan üretilen özgün miRNA'lar ve ST2 miyokard dokusundan veya koroner endotel hücrelerinden ayrılarak PS'ye geçebilmektedir (9). KVH'ta miRNA'ların etkisi genellikle mesajcı RNA (mRNA) üzerinden olurken, ST2 ise immün ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayarak etkisini interlökin 33 (IL33) ile beraber göstermektedir (10, 7).

Kalpte doğal bağışıklığın sonucu olarak kalbi aşırı basınç yükü ve gerilmeye karşı koruyan ST2 iki önemli izoforma (ST2L -membrana bağlı, sST2-çözünür halde) sahiptir

(11). ST2L ve sST2'nin ligandı IL33 tür. ST2L'nin IL33'e bağlanması kardiyoprotektif sinyal kaskadını tetiklerken sST2'nin IL33'e bağlanması bu olumlu etkilerin ortadan kalkmasına neden olur. Yüksek seviyede sST2 kalbin yoğun stres altında olduğunu göstermektedir. Bu durum hücrel ölüm, doku fibrozisine, azalmış kalp fonksiyonlarına ve hastalığın ilerleyiş hızının artmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı sST2 kardiyovasküler hastalıkta bireylerde kötüleşen prognoz bir biyobelirteci olarak kabul edilmektedir (10). sST2'nin normal konsantrasyonunun üzerine çıkması kardiyovasküler hastalıklara bağlı olumsuz durumları 3 kat artırdığı tespit edilmiştir (12). 2013 yılında ACCF/AHA (American College of Cardiology Foundation/American Heart Association) rehberinde HF (Heart failure) için "novel biyobelirteç" olarak tanımlanan sST2; natriüretik peptidler ve kardiyak troponinlerden (cTnI) bağımsız bir biyobelirteç olup kardiyovasküler hastalıklarda önemli bir işarettir (12, 13, 14). ST2 yaş, beden kitle indeksi ve böbrek fonksiyon bozukluğu gibi faktörlerden etkilenmemektedir (13, 14, 15, 16). sST2 seviyesinin miRNA'larla olan ilişkisi dair araştırmalar olmasına karşın henüz tam olarak aydınlatılmamıştır; örneğin; hipertrofi ve fibrosis oluşumunda miRNA'ların IL33/ST2 sinyal yolağındaki etkisi çalışılmasına rağmen belirsizliğini korumaktadır (17).

KAH'taki ST2'nin vermiş olduğu öngörünün yanında teşhis için miRNA'lar kullanılabilir. Organizmaların gelişiminde önemli bir rol oynayan ve kilit bir molekül olan miRNA'lar hücrelerin normal işlevinde, canlı gelişiminde, biyolojik işlemler ve kardiyovasküler hastalığını da içine alan birçok hastalıkla ilişkilidir (18). Dokular arasında farklı şekilde ifade edilen miRNA'lar hücrede, hücre dışında, dolaşım ve vücut sıvılarında bulunmaktadır. Dokuların-hücrelerin ve sıvıların kendine has miRNA'ları bulunabilmektedir (5). Memeli transkriptinin yaklaşık % 60'ından fazlası miRNA'ların kontrolü altındadır (19, 20). miRNA'lar mikroveziküller, Argonaute 2, HDL lipoprotein ve nükleofosmin gibi proteinlerle taşınarak ribonükleaz aktivitesine karşı kendilerini korumakta ve böylece uzak bölgelere taşınarak o bölgede gen ifadesine etki etmektedir. Böylece taşınan miRNA'lar hücreler arası iletişimde rol oynamaktadır (6), bu miRNA'lar moleküler teşhis ve tedavi için biyobelirteç olma yönünde hızlı gelişmeler kaydetmektedir (21). Dokuya özel gelişimlerde rol alıp hedef genlerde düzenleme yapabilen miRNA'lar kardiyovasküler hastalıklarda farklı düzeylerde olup cTnI gibi önemli kardiyak belirteçlere göre daha hassas bilgiler vermektedir (6). Feng Wang ve ark. tarafından yapılan çalışmada KAH'ta miRNA 133a

için teşhis doğruluk değeri 0,918 çıkarken, cTnI için doğruluk değeri 0,741 çıkmıştır (6). Fakat bu miRNA'lar sadece kalpte değil aynı zamanda iskelet kasında da ifade edildiğinden bu durum miRNA'ların özgünlüğünü olumsuz yönde etkilemektedir. miRNA'lar ile hastalıkların tanısı için; serum, beyin-omurilik sıvısı, göz sıvısı, süt, safra, karın zarı sıvısı, ovaryen folikül sıvısı, idrar, tam kan, nazal sekresyon, tükürük, plevral efüzyon ve feçes gibi biyolojik sıvı ve dokular kullanılmaktadır (19, 22, 23, 24). Belirlenen bazı durumlara rağmen KAH için majör risk faktörü olan ve birçok parametre üzerine etkisi olan miRNA'ların ST2 üzerine etkisi henüz açığa kavuşturulamamıştır.

Suvi M. Kuosmanen ve ark. tarafından yapılan çalışmada PS'de 742 miRNA taranmış ve her bir örnekte ortalama 256 miRNA tespit edilmiştir (21). Çalışmada PS için 6 spesifik miRNA (miR 125-5p, miR 320b, miR 34a-5p, miR 497-5p, miR 99b-5p, let 7d-3p) tespit edilmiştir. Aynı çalışmada miR 21-5p, miR 451a, miR 125b-5p, miR 7b-5p, ve miR 16-5p'nin tüm hastalarda en fazla bulunurken; miR 26b-5p, miR 29b, miR 125, miR 320, miR 34, miR 497 ise tüm sıvılarda ortak bulunmuştur. Bu sonuçlar elde edilmesine rağmen bulunan bu miRNA'ların kardiyak patolojiler açısından anlamı tespit edilememiştir. Tespit edilen bu miRNA'ların kardiyak hücreler arasında iletişimde rol oynadığı tahmin edilmiştir (21, 25). KAH için ST2 ve miRNA araştırmaları ayrı ayrı yapılmış olmasına rağmen aralarındaki ilişki saptanmamıştır. Bu konuda sadece IL33 ile ST2 arasında bir etki olduğu ve miRNA'ların bu süreçte sadece inflamatuvar yanıtta rol oynadığıyla ilgili çalışma vardır (17). Yapılan literatür araştırması sonucunda PS'ye özgü olarak bulunan bazı miRNA'ların ST2'yi hedefleyebileceği tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasının temel amacı; PS ve kan plazmasına geçen ST2'nin ve ST2'yi hedefleyen miRNA'ların (miR-125b-5p, miR-320b, miR-34a-5p, miR-16-5p, miR-320a ve miR-15a-5p) koroner arter hastalarındaki ifadesinin tespit edilmesi, miRNA-ST2 ilişkisinin saptanması ile hastalığın patofizyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlamaktır. sST2'nin artış mekanizmasının bilinmemesi, PS'de ST2 çalışmasının olmaması, ST2-miRNA ilişkisinin bilinmemesi ve IL33/ST2 yolağıyla ilgili cevaplanmamış sorular bulunması bu çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada KAH'ta PS ve kan plazmasında ilk kez ST2'nin ifade seviyesine bakılmış olup ST2'yi hedef alan miRNA'lar tanımlanarak bu miRNA'ların hem ST2'nin ifadesi üzerinde etkisi hem de KAH oluşumundaki etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koroner Arter Hastalığı

Kalp kaynaklı göğüste oluşan ağrı için "Angina Pectoris" terimi ilk defa William Heberden tarafından kullanılmış ve bu terim 1768'de tanımlanmıştır. 1910 yılında akut miyokard infarktüsü patogenezi hakkında önemli açıklamalarda bulunan William Osler'den sonra koroner arter hastalığı (KAH, CAD-Coronary artery disease) tanı ve tedavisi üzerinde ciddi şekilde gelişmeler kaydedilmiştir (26).

Son zamanlarda bütün dünyada olduğu gibi, Türkiyede'de mortalite ve morbiditenin başlıca nedeni olan koroner arter hastalığı bir veya daha fazla koroner damarın duvarlarında patolojik değişiklikler veya arteroskleroz varlığını içerir (27).

Günümüzde birçok Avrupa ülkesinde ve Amerika Birleşik Devletlerinde koroner arter hastalığının mortalitesinde ciddi düşüş olmasına karşın, bu hastalığa bağlı ölümlerin sayısında bir azalma maalesef olmamıştır (28, 29). Dünya genelinde 35 yaş üzerindeki birey ölümlerinin yaklaşık üçte birinden KAH sorumlu tutulmaktadır (30, 31). Önemli yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'ndeki orta yaşlı erkeklerin yaklaşık yarısında, orta yaşlı kadınların ise üçte birinde KAH bulguları çıkacağı tahmin edilmektedir. Bu epidemiyolojik değişime sebep olarak beklenen yaşam sürelerinin uzaması, kişinin yaşam tarzındaki değişiklikler ve özellikle tıp alanında olan teknolojik gelişmeler gösterilmektedir. Son yıllarda medikal tedavi ve müdahale (bypass cerrahisi ve perkütan koroner girişim) daha iyi sonuçlar vermiştir ki bu durum hastalığın akut gelişiminden daha fazla hastanın hayatta kalmasını sağlamıştır (27).

Ülkemizde gerçekleştirilen Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri (TEKHARF) çalışmasına göre her yıl yaklaşık toplam 230 bin yeni koroner olay gerçekleşmektedir. Aynı çalışmaya göre kalp hastalıklarından dolayı ülkemizde yılda 160.000 erkek ile 120.000 kadının hayatını kaybettiği, koroner hastalıklara bağlı olarak 66.000 erkek ve 61.000 kadının öldüğü tahmin edilmektedir (32). Koroner arter hastalıkları 7 değişik şekilde (kararlı ve kararsız angina pectoris, sessiz iskemiler, akut miyokard infarktüsü (MI), kalp yetersizliği, ritim ileti bozuklukları ve ani ölüm) kendisini göstermektedir.

2.1.1. Koroner arter hastalığının prevalansı

En yaygın halk hastalıklarından biri olan KAH'nın prevalansı dünya genelinde giderek artmaktadır. KAH'ta bildirilen bu yaygınlık hem kadınlarda hem de erkeklerde yaşla birlikte artmaktadır. Kalp hastalığı mortalitesi Birleşik Devletler (USA) ile ekonomilerin ve sağlık bakım sistemlerinin nispeten gelişmiş olduğu bölgelerde azalmasına rağmen tüm dünyada oldukça farklıdır (33). Koroner arter hastalığı hem düşük gelirli hem orta gelirli ülkelerin hem de yüksek gelirli ülkelerde erişkinlerde ölümlerin bir numaralı nedenidir (33). Avrupa'da yaklaşık 14 milyon kişi kalp yetmezliğine sahip olup 2020 yılında bu rakamın 30 milyon kişiye ulaşması beklenmektedir.

Yapılan çalışmalar ile ayrıca 2020 yılına kadar kardiyovasküler hastalıklara bağlı mortalitenin % 28.9'dan % 36.3'e yükseleceği tahmin edilmektedir (2). Koroner arter hastalığı ve inme başta olmak üzere, kalp damar hastalıklarından ölümlerin 2030 yılında 23 milyona ulaşması tahmin edilmektedir (34). Koroner damar hastalıkları kalp damar hastalığına bağlı ölümlerin % 42'sinden sorumludur (35). Alınan tedbirler sayesinde bulaşıcı hastalıklarına bağlı ölümler ve anne çocuk ölümleri giderek azalırken, kardiyovasküler hastalıklar ölüm nedeni arasında lider olmaya devam etmektedir (36).

2020 yılına kadar gelişmiş ülkelerde KAH mortalitesinin kadınlarda % 29, erkeklerde ise % 48 oranında artması beklenmektedir. WHO'nun elindeki verilerine göre KAH'ye bağlı ölümler yirmi yılda kadınlarda % 120, erkeklerde % 137 artacaktır (37). ABD'de yatan hasta tedavi giderlerinin dörtte birini KAH'a bağlı hastalıklar oluşturmakta olup bu durumun yıllık 71.2 milyar dolara mal olmaktadır (3). Avrupa Birliğinde yaşayan insanlarda ise kalp yetmezliği tedavisi yıllık 200 milyar euroyu aşmakta olup bu masrafın % 70'i yatan hastalara aittir. KAH çok önemli olduğundan dolayı dünyamızdaki uluslararası liderler, gelişmekte olan ülkelerdeki tahmini küresel salgın iskemik kalp hastalığının önlenmesi için eylem planları çağrısında bulunmaktadırlar (38).

2.1.2. Koroner arter hastalığında genel risk faktörleri

Koroner arter hastalığı; arteriyel sertleşme veya arterosklerozun olarak adlandırılan koroner arterlerden birinin duvarında patolojik değişikliklerin oluşmasını içerip, akut miyokard enfarktüsü (AMI) veya kararsız angina pectoris gibi akut koroner olayların en yaygın nedenini oluşturmaktadır (39).

Yaşlılık, erkek cinsiyet, kalıtsal faktörler, fiziksel hareketsizlik, sigara kullanımı, yüksek tansiyon, kan dolaşımı bozuklukları, kilo / şişmanlık ve şeker hastalığı gibi risk faktörleri KAH'ın gelişme riskini artırır (39).

Birçok kişide benzer oranda geleneksel risk faktörleri olsa da hastalığın ciddiyeti ve seyri farklı olmaktadır. Ortada var olan bu durum bize geleneksel risk faktörlerin dışında yeni risk faktörlerinin olduğunu göstermektedir. Yeni keşfedilen bu risk faktörleri arasında örneğin miRNA, ST2, GDF-15, homosistein, fetuin A, lipoprotein a (Lp a), genetik mutasyonlar, hemostatik veya trombojenik gibi risk faktörleri ile kan dolaşımındaki antioksidan düşüklüğü gibi birçok faktör bulunmaktadır.

2.1.3. Akut koroner sendrom ve miyokard infarktüsü

Akut koroner sendrom (AKS-acute coronary syndrome-ACS) terimi miyokardiyal iskemi şüphesi bulunan hastalar için kullanılır. Üç tip AKS vardır: Bunlar; ST yükselmesi olan miyokard infarktüsü (STEMI), ST yükselmesi olmayan MI (NSTEMI) ve kararsız anginadır (unstable angina-UA). STEMI ve NSTEMI'de miyokardiyal iskemide tipik bir artış ve / veya miyosit hasarının biyolojik belirteçlerinde değişimler bulunur. 2007'de Avrupa Kardiyoloji Derneği, Amerikan Kardiyoloji Koleji Vakfı, Amerikan Kalp Derneği ve Dünya Sağlık Federasyonundan (ESC / ACCF / AHA / WHF) oluşan ortak görev gücü 2000 yılındaki kriterlerini rafine ederek akut MI'yi miyokardit veya travma gibi diğer etiyolojilerin aksine klinik bir olay olarak tanımlamıştır. Bu tanıma göre; MI iskemi nedeniyle ortaya çıkan kalp miyositlerinin (miyokardiyal nekroz) ölümünden sonra ortaya çıkmaktadır (40).

MI'ı tanımlamak için kullanılan kriterler hastanın klinik durumuna bağlı olarak farklılık göstermektedir. Buna göre gösterge olarak akut MI şüphesi olanlar arasında koroner arter bypass greft cerrahisi geçiren veya perkütan müdahale uygulanan hastalar veya ani beklenmedik ölüm olsun ya da olmasın kalp krizi geçiren kişiler bulunmaktadır (40). Günümüzde revaskülarizasyon geçiren, kardiyak arrest veya ölümle sonuçlanan hastalarda MI teşhisi için kriterler tablolar halinde ayrıntılı olarak verilmektedir.

2.1.4. Koroner arter hastalığında semptomlar / klinik özellikler

Akut koroner arter hastalığında baskın olan belirti genellikle merkezi göğüs ağrısı olup bu durum hem kararsız angina hem de AMI içermektedir. Angina pectoris; miyokardiyal iskeminin neden olduğu göğüs veya bitişik bölgelerde bir rahatsızlık olup genellikle miyokardiyal nekroz olmaksızın harekete geçen ve miyokard işlevinde

bozulma ile birlikte seyreden hastalıktır. Heberden'in anjinasının "boğulma ve kaygı" duygusunu aktardığı ilk açıklaması hala oldukça ilgi çekici olup; bu sıkıntıyı tanımlamak için sıkça kullanılan diğer sıfatlar; gözenek, daralma, boğucu olma, ezilme, ağırlık ve sıkma şeklindedir (41). Bununla birlikte angina pectoris; başlangıçta genellikle nefes darlığı, mide bulantısı veya diğer ağrı biçimleri gibi daha spesifik olmayan semptomlar gösterir. Arterlerin daralmasından kaynaklı olan anjina pectoris belirgin kötüleşme belirtileri göstermeden en az birkaç hafta semptomlar ortaya çıktığında bu durum kararlı olarak tanımlanmaktadır. Anginanın farklı türleri mevcut olup örneğin Efor anjina; egzersiz durduktan sonra hızla kesilen fiziksel veya zihinsel stres tarafından indüklenen anjindir. Varyant (spazm) anjina ise kalp kasının belirti üreterek oksijen yetersizliğine maruz kaldığı kadar uzun süren ve bir arterin daralmasıyla indüklenen bir anjin olarak kabul edilir. Varyant angina dinlenme sırasında ortaya çıkabilmektedir (42).

Stabil anginalı bireylerin prognozu günümüzde nispeten iyi olup, bununla birlikte çoğu durumda acil hastane bakımı gerektiren ve hızlı bir kötüleşme ile karakterize olan angina'nın destabilizasyonuna karşı dikkatli olunması önemlidir (43). Çoğu bireyde koroner arterde aterosklerotik plak fissürü veya rüptürü, akut koroner arter hastalığı nedenidir (44). Koroner arter hastalığında semptom nedenlerinden bir diğeri olan iskemi; kan sağlayan arterin kısmen veya tamamen kapandığı, oksijenin ve besin maddelerinin alınmasına engel durumlarında oluşur. Bir arter engellendiğinde, iskemi derecesine ve ne kadar süreceğine bağlı olarak kardiyak hücre ölümüne doğru kademeli bir değişim meydana gelir (45).

Miyokard infarktüsü sonrasında kalpte oluşan yapısal değişiklikler enfarkt bölgesi ile sınırlı olmayıp aynı zamanda hasar gören bölgede fonksiyon kaybını telafi etmek zorunda olan sağlıklı miyokarda'da yayılmaktadır. Yani hasar yan dokulara da kaymaktadır. Kalp kası hipertrofisi ve kollajenin sağlıklı bölgede depolanması daha zayıf enerji dengesine sahip daha sert bir kalbin oluşmasına neden olmaktadır (46).

2.1.5. Koroner arter hastalığında teşhis

Durum değerlendirilmesi genellikle EKG testi ile birlikte klinik muayene, egzersiz testi, diğer non invaziv testler ile invaziv anjiyografi kullanılarak gerçekleştirilir. Yapılan değerlendirmeler ve işlemler sonucunda hastanın risk faktörlerine, ağrının tanımına ve ilişkili semptomlara dayalı olarak sıklıkla bir tanı şekli ortaya çıkmaktadır (47).

AKS'li hastalar artmış ölüm ve ölümcül olmayan kardiyak olay riskine sahip olduklarından, klinisyenler değerlendirme ve tedavi planlarını formüle etmek için prognozu bireysel olarak değerlendirmektedir. Teşhis ve prognozun değerlendirilmesi, tedavinin başlangıcına paralel olarak mümkün olduğunca erken başlatılmalıdır. Kişide akut koroner arter hastalığı şüphesi varsa hasta hastanede yatırılmalı ve mümkün olduğunca kısa sürede PCI ile tedavi edilmelidir (48). Tüm iskemik atakların % 75'ini oluşturduğu düşünülen sessiz iskemi (silent ischemia) egzersiz testi, ambulator 24 saatlik elektrokardiyografik kayıt (ambulatory 24 hour electrocardiographic recording) veya periyodik rutin EKG ile aydınlatılabilir (49).

2.1.6. Koroner arter hastalığında patofizyolojik mekanizmalar

2.1.6.1. Hücresel seviyedeki mekanizma

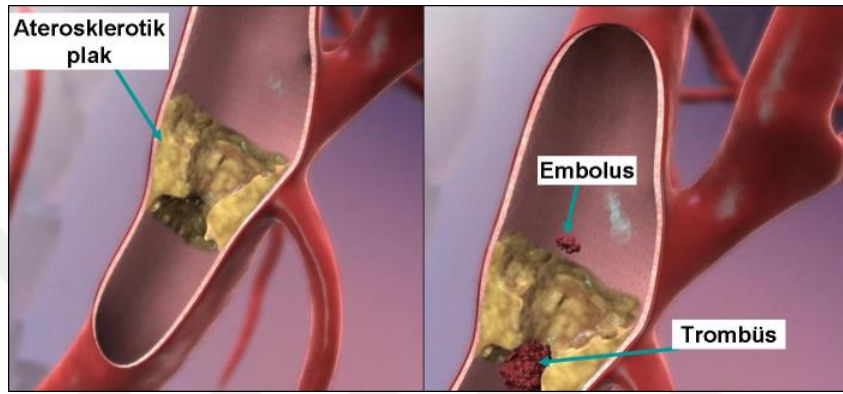
Angina, miyokardiyal oksijen talebinin oksijen kaynağını aştığı durumda ortaya çıkan miyokardiyal iskemiden kaynaklanır. Kalbe oksijen verilmesi koroner kan akışıyla yakından bağlantılı olduğundan trombotik koroner oklüzyon sonrasında bölgesel perfüzyonun ani kesilmesi aerobik metabolizmanın durmasına, kreatin fosfatın tükenmesi ve anaerobik glikoliz başlangıcına yol açar. Bunu takiben kalp dokusunda laktat birikimi, ATP seviyelerinde aşamalı bir azalma ve adenin nükleotid havuzu dâhil olmak üzere katabolitlerin birikimi olur. İskemi devam ederken, doku asidozu gelişir ve ekstraselüler alana bir potasyum akışı oluşur. Sonuç olarak; ATP seviyeleri, kritik membran fonksiyonunu sürdürmek için gerekli olanın altında kalır ve sonuçta kardiyomiyosit ölümünün başlangıcı olur. Tersinir olmayan miyokardiyal hasar önemli kolleteraller olmadan 20 dakika koroner oklüzyon sonrası başlar (50).

Geri dönüşsüz yaralanma, alt endokardiyada (subendocardium) başlar ve alt endokardiyal tabakalardan alt epikardiyal tabakalara kadar zamanla dalga cephesi olarak ilerler. Bu durum subendokartta yüksek oksijen tüketimini ve düşük koroner basınçtaki akışın sıkıştırıcı belirleyicileri tarafından kalbin dış katmanlarına kollateral akışın yeniden dağıtılmasını yansıtır.

Miyokard oksijen tüketimini (örneğin; taşikardi) arttıran veya oksijenlendirmeyi (örneğin; Anemi, arteriyel hipotansiyonu) düşüren faktörler geri dönüşsüz hasarın ilerlemesini hızlandırır. Aksine oklüzyon öncesinde tekrarlayan reversibl iskemik veya angina, önkoşullamayla (preconditioning) geri döndürülemez yaralanmayı azaltabilir (51).

2.1.6.2. Anatomik düzeydeki mekanizma

AKS genellikle kararsız aterosklerotik plak rüptürü ve lezyonun üzerine gelen trombositlerden zengin trombüs ile ciddi daralmadan meydana gelir (Şekil 2.1). Daralmadan dolayı kan dolaşımındaki ani düşüş genellikle göğüs ağrısı ve iskemi göstergesi olan EKG değişikliklerine neden olur. Var olan bu durum uzarsa miyokardiyal nekroz ve enzim yükselmesi oluşur. ST yükselmesiz miyokard enfarktüsü (non STEMI), miyokardiyal talebin miyokardiyal arzı aştığı benzer bir klinik tabloya neden olan hastalıklardan kaynaklanır.



Şekil 2.1. AKS gelişimi

2.1.6.3. Ateroskleroz patogenezi- koroner arter kalsifikasyonu

Koroner arter kalsifikasyonu (KAK) koroner arterlerin kalsifiye olması demektir. Kemik oluşumunu ve büyümeyi etkileyen kalsiyum düzenleyici mekanizmalar KAK'ı da etkiler. Alkalen fosfataz erken kalsiyum birikimi için merkezi bir konu olup vasküler kalsifikasyonun bir moleküler markeri olarak ön plandadır (52, 53). Vasküler düz kas hücreleri (VSMC), vasküler intima ve ortamdaki mineralizasyonu düzenleyen diğer etmenler matris vezikülleri üretir (52, 54). Diğer hücre tipleri (örneğin mikrovasküler perisitler ve adventif myofibroblastlar) ise mineralize matris üretme potansiyeline sahip olup, osteoblastik farklılaşmaya uğrayarak kalsifiye tortular oluşturur (52). Koroner arter kalsifikasyonu aterosklerotik ve medial arter kalsifikasyonu şeklinde iki tip olup, aterosklerotik kalsifikasyon esas olarak intima'da görülür (52).

Ateroskleroz akut koroner arter hastalığının baskın nedenidir. Genellikle orta çaplı arterlerde olmak üzere, bütün kan damarlarını etkileyen ateroskleroz sistemik arteriyal bir hastalıktır (55). Genellikle erken yaşlarda yağlı çizgilenmelerin oluşmasıyla başlayan aterosklerozun klinik bulguları orta ve ileri yaşlarda görülmektedir.

Ateroskleroz kronik ve ilerleyici bir süreç olup endotel disfonksiyonu ile yakından ilişkilidir. Ateroskleroz öncelikli olarak endotel hücrelerinden oluşan intima'nın arter duvarının en derin katmanına saldırılmaktadır. Hastalık başlangıçta kan lipidlerinin depolanması; inflamatuvar hücrelerin, makrofajların ve emilen yağların bulunduğu yer olan endotel hücreleri arasında oluşmaktadır. Bu süreçte intimal düz kas hücrelerinde birikim ve proliferasyon olmakta, T lenfosit ve makrofajların infiltrasyonu gerçekleşmektedir. Aterosklerozda elastin, kollajen, fibronektin ile proteoglikanlardan zengin bağ dokusu matriksi meydana gelmekte ayrıca hücreler içinde ve çevresinde bağ dokusunda lipid depolanması (serbest kolesterol, kolesterol esterleri şeklinde) olmaktadır. Ateroskleroz sürecinde makrofajlar patlayıp "köpük hücreler" haline gelene kadar lipidleri sindirmektedir. Daha sonra köpük hücrenin etrafında elyafı bir kütle geliştirmekte ve plak oluşmaktadır. Bu süreçte oluşan ateroplağın içeriği değişkenlik göstermektedir. Bu durum lezyonların heterojenik yapısında olmasından kaynaklanmaktadır. Ateroskleroz sürecinde genellikle arterin intima tabakası etkilenirken, media ve adventetisya tabakasında da sekonder değişimler görülebilmektedir (56).

Oluşan aterosklerotik plaklar tüm damara saldırmayıp bölge bölge yamalarda görünmektedir. Hastalıkta arteriyel dal noktalarının etrafındaki alan özellikle hassastır (43, 44). Zaman geçtikçe gelişen aterosklerotik plaklar arterlerde darlıklara neden olarak farklı klinik durumların oluşmasına neden olmaktadır. Bu oluşan önemli durumlardan birisi plakların yırtılması, diğeri ise plak fissürüne (çatlak) veya erozyonuna bağlı olarak gelişen aterotromboz durumudur.

Koroner arter kalsifikasyonu vasküler kompliyansın azalması, anormal vazomotor yanıtlar ve bozulmuş miyokard perfüzyonu ile sonuçlanır (57, 58). KAK'ın varlığı genel popülasyonda ve revaskülarizasyon yapılan hastalarda daha kötü bir şekilde sonuçlanmıştır (59, 60). KAK prevalansı yaş ve cinsiyete bağlı olarak erkeklerin% 90'ında ve 70 yaşın üzerindeki kadınların % 67'sinde ortaya çıkmaktadır (61, 62). KAK'ın derecesi, ateroskleroz derecesi ve gelecekteki kardiyak olayların görülme oranı ile kuvvetli bir korelasyona sahiptir (63).

2.1.7. Normal damarın endotel yapısı ve fonksiyonları

Bütün damarların düz kaslarında bulunan endotel tabakası; ince bir epitel tabaka şeklinde damar duvarını kaplamaktadır. Vasküler fonksiyonların normal şekilde

yürümesinde önemli rol oynayan endotel vücuttaki en büyük endokrin organdır. Vücuttaki ortalama endotel hücre sayısı 1 trilyon civarında olup, yaklaşık olarak toplam ağırlığı 1800 gr'dır (64). Normal kan akışına karşı tromborezistan yüzey görevi üstlenen endotel ayrıca morfolojik yapısından ve stratejik anatomik pozisyonundan dolayı bariyer görevi görmektedir. Endotelin oluşturduğu bariyer yapı selektif geçirgen yapı şeklinde olup, damarın düz kas hücreleri ile kan dolaşımının komponentleri arasında bulunmaktadır. Bu sebepten dolayı normal endotel hücrelerinin lümenal yüzeyleri nonadhezif bir yapıdadır. Birçok önemli görevinin yanında endotel hücreleri ayrıca; koagülasyon, damar tonusunun düzenlenmesinde, lökosit migrasyonunda, düz kas hücre proliferasyonu ile migrasyonunun önlenmesi ve stimülasyonu gibi birçok çeşitli olaylarda rol oynamaktadır (65). Endotelden salınan vazodilatörler arasında nitrik oksit (NO), prostasiklin ve bradikinin bulunmakta olup bunlar periferik vasküler direncini denetlemektedir. Endotelin ve angiotensin II gibi vazokonstriktör maddeleri de üreten endotel ayrıca; damar içi akım hızı ve basıncını da iyon kanallarıyla düzenlemektedir. Akım hızındaki artışa karşı kalsiyum, potasyum ve sodyum gibi iyon kanallarını etkileyerek nitrik oksit sentaz enzimini aktive eden endotel hücreleri bu sayede NO sentezini uyarmaktadır (66).

2.1.8. Endotel disfonksiyonu

Endotel bağımlı vazodilatasyondaki bozulma olarak nitelendirilen endotel disfonksiyonunda antikoagülan özellik kaybolmakta ve hücresel adezyon moleküllerinde ise ifade seviyesi artmaktadır. Bu olayların sonucunda endotel fonksiyon özelliği kaybolmaktadır. Endotel fonksiyonunun kaybolmasıyla lökosit, trombosit ve çeşitli düzenleyici maddeler ile damar duvarı arasındaki ilişkide anormallikler olmaktadır (67). Endotel disfonksiyonunda ilk başta vazodilatasyon bozulmaktadır. Endoteldeki NO üretimi veya aktivitesinde oluşan bozukluk koroner arter hastalığı, kalp yetmezliği, hipertansiyon, şeker (DM), böbrek, obezite ve metabolik sendrom gibi birçok hastalığa zemin hazırlamaktadır. Kardiyovasküler sistemi hedef alan bu olaylar neticesinde ise ateroskleroz hızlanmaktadır (68).

2.1.9. Ateroskleroz için risk faktörleri

Aterosklerozun oluşmasında sigara, fiziksel durgunluk, fazla kilo, lipid bozukluğu, HT, DM, insülin rezistansı, yaş, ailesel genetik yatkınlık, cinsiyet, Lp a, homosistein, trombotik ve inflamatuvar faktörler önemli rol oynamaktadır. Bu faktörlerden fiziksel durgunluk, sigara ve obezite yaşam tarzı değişiklikleri ile modifiye edilebilirken; lipid

bozuklukları, HT, DM ve insülin rezistansı yaşam tarzında yapılacak değişikliklerle ve/veya ilaçlarla modifiye edilebilmektedir. Aterosklerozun sebepleri arasında olan fakat modifiye edilemeyen faktörler arasında ise yaş, ailesel genetik yatkınlık ve cinsiyet gibi durumlar bulunurken; Lp a, homosistein, trombotik ve inflamatuvar faktörler ise aterosklerozda yeni risk faktörlerini oluşturmaktadır. Risk faktörlerinin hepsi aterosklerozun başlangıcında ve ilerlemesinde önemli roller üstlenmektedir (69, 70).

2.1.9.1. Yaş ve cinsiyet

Ateroskleroz oluşumunda en güçlü risk belirtecinden birisi yaş olup bu durum akut koroner sendrom (AKS) gelişimini de tetiklemektedir. Erkekler arasında yaşın ilerlemesi ile risk artışı tetiklemektedir. Premenapozal dönemdeki kadınlar ile erkekler karşılaştırıldığında erkekler KAH'la yaklaşık 10 yaş daha erken karşılaşmaktadır. Kadınlarda ise postmenapozal dönemde risk artmasına rağmen yaş grupları arasında değerlendirmeye bakıldığında risk oranı erkeklere göre daha düşük kalmaktadır (70).

2.1.9.2. Sigara

Sempatik sinir sistemini uyarmanın yanı sıra kan basıncını artıran ve miyokardta oksijen sunumunu azaltan sigaranın ayrıca aterotromboz üzerine de birçok etkisi bulunmaktadır. Düşük dansite lipoprotein (LDL) oksidasyonunu artıran sigara ayrıca; endotel bağımlı vazodilatasyonu bozmakta, C reaktif proteinde (CRP), adezyon moleküllerinde (intersellüler), fibrinojen ile homosistein seviyelerinde ise artışa sebep olmaktadır. Koroner arter hastalığının riskini 23 kat artıran sigara aynı zamanda; diğer risk faktörleri ile etkileşerek KAH ile ilgili olumsuz durumun artışına neden olmaktadır. Sigara içen kişilerde yapılan araştırmaya göre miyokard infarktüsü ve kalp hastalıklarından ölüm riski sigara içmeyenlere göre erkek bireylerde 2.7, kadın bireylerde ise 4.7 kat daha fazla bulunmuştur. Yapılan birçok araştırmaya göre sigaranın bırakılması ile KAH'a bağlı olumsuz olaylarda düşüş gözlenmiştir (71).

2.1.9.3. Lipidlerin rolü

Yapılan araştırmalara göre plazmada total kolesterol, LDL ile çok düşük dansite lipoprotein (VLDL) seviyelerindeki artış ateroskleroz ile ilişkili bulunmuştur. Benzer araştırmalara göre bahsedilen bu lipoproteinlerin plazmadaki seviyeleri düşürüldüğü takdirde buna bağlı olarak aterosklerozunda azaldığı tespit edilmiştir. LDL kolesterol seviyesindeki yükseklik endotel hasarı ile damar çeperindeki inflamatuvar yanıtın

artışıyla ilişkili bulunmuştur. Oluşan inflamatuvar süreç intima tabakasına trigliseridden zengin lipoproteinlerin geçmesiyle hızlanmaktadır. Oluşan bu olaylar sonucunda düz kas hücre proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks birikimigerçekleşir (70, 72). Yapılan araştırmalara göre kan plazmasındaki total kolesterol seviyesinin %10'luk azalması 5 yıllık KAH insidasını % 25'lik aşağıya çekmektedir. LDL kolesterol seviyesinde ise 40 mg/dL azalma kardiyovasküler olayların % 20 oranında daha az görülmesini sağlamaktadır (73). İyi huylu lipoprotein olarak adlandırılan HDL kolesterol ise arter duvarında bulunan kolesterolü toplayarak katabolizmasını hızlandırmakta ve plak oluşumunu engelleyerek ateroskleroza karşı koruyucu etkiye sahip olmaktadır (74).

2.1.9.4. Metabolik sendrom

Metabolik sendrom, anormal yağ depolanmasına ve işlevine eşlik eden insülin direncinden kaynaklanan çoklayıcı bir risk faktörüdür. Koroner kalp hastalığının yanı sıra diyabet, yağlı karaciğer ve çeşitli kanserler için bir risk faktörü kombinasyonu olarak tanımlanan metabolik sendrom ile ilgili yapılan bir çok çalışmada metabolik sendrom varlığında MI riskinin en az 2 kat arttığı belirlenmiştir (70).

2.1.9.5. Diyabet ve insülin direnci

Diyabette sürekli olarak oluşan hiperglisemi glikolize son ürün üretiminde artışa yol açmakta ve böylece arteriyal inflamasyonu tetiklemekte, endotel ve düz kasta hücre fonksiyon bozukluğu meydana gelmektedir. Diyabet hastalarında ayrıca lökositlerin endotele yapışması, trombosit agregasyonu ve koagülasyon sisteminde aktivite artışı gözlenmektedir. Diyabette oluşan insülin direnci, hastalığın ilk aşamalarında bile ciddi anlamda ateroskleroza belirgin bir şekilde katkı sağlamaktadır. İnsülin duyarlılığını bozan adipoz doku ise sitokinleri salgılayarak sistemik inflamatuvar yanıtına yol açmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm riski diyabetli hastalarda 2 ile 6 kat artmaktadır (70, 75).

2.1.9.6. Hipertansiyon

Tek başına ateroskleroza bağlı kardiyovasküler olayların % 35'inden sorumlu olan hipertansiyon kan basıncında yükselmeye yol açarak endotel fonksiyonlarda bozulmaya neden olmakta ve ateroskleroz patogenezinde rol oynamaktadır.

2.1.9.7. Ailesel yatkınlık-genetik değerlendirme

Genetik etkiye bağlı olarak gelişen koroner arter hastalığı genellikle poligenik olup, çok az bir hasta grubunda ise tek gen mutasyonu şeklinde gözlenmektedir. Kardiyovasküler

hastalıklar üzerine genlerin etkisi üzerine yapılan çalışmalar çok komplike olduğundan dolayı genetik ile kalp damar hastalık ilişkisi çok güçlü bir şekilde gösterilememiştir (76, 77). Kalp damar hastalıklarında hastanın aile hikâyesi hem genetik şüpheyi ortaya koymakta hem de kültürel, çevresel ve davranışsal faktörler arasında olan ilişkiyi yansıtmaktadır. Birinci derece erkek akrabada 55 yaşından önce, kadın akrabada ise 65 yaşından önce koroner arter hastalığının olması ilgili kişide ateroskleroz riskini yaklaşık olarak 2 kat arttırmaktadır. Birinci derece iki veya daha fazla akrabada var olan koroner arter hastalığı ise bu riski 36 kat artırmaktadır (76). Bir kişinin KAH'a sahip yakın akraba sayısının artması veya ailesinde olan KAH'a yakalanma yaşının azalması kritik değeri artırmaktadır (76, 78).

2.1.10. Koroner arter hastalığında toplam riskin hesaplanması

Tanımlanmış olan klasik risk faktörlerinin ışığında, risk grupları düşük, orta ve yüksek risk grupları şeklinde sınıflandırılmaktadır (79, 80). Düşük risk grubunun içinde; on yılda KAH gelişme ihtimali % 10'un altında olan kişiler bulunmaktadır. Risk faktörü olmayan kişiler ile en fazla 2 risk faktörüne sahip olan bireyler bu grupta bulunmaktadır. Orta risk grubunun içinde; on yılda KAH gelişme ihtimali % 10 ile 20 arasında olan gruptur. Bu grubun içerisine, henüz koroner kalp hastalığı gelişmemiş kişiler ile 3 veya 3 üzeri risk faktörüne sahip bireyler girmektedir. Yüksek risk grubunun içinde; on yılda KAH gelişme ihtimali % 20 ve üzeri olan gruptur.

2.1.11. Koroner arter hastalığında yeni risk faktörleri

Homosistein, Follistatin-like 1 (FSTL1), Growth differentiation factor-15 (GDF-15), Lpa, miRNA, sST2, inflamatuvar ve trombotik faktörler gibi son zamanlarda ortaya çıkan yeni risk faktörleri koroner arter hastalığı oluşumunda son derece önemli olup bu durum çeşitli araştırma ve meta analizlerde ortaya çıkmıştır. Bu faktörler aterosklerozun başlangıcında ve ilerlemesinde önemli roller üstlenmektedir (70, 81).

2.1.12. Koroner arter hastalığında tedavi prensipleri

Semptom başlangıcından sonra mümkün olan en kısa sürede başlatılması gereken akut koroner arter hastalığının tedavisi; anti-iskemik, antihipertansif ve kan lipid düşürücü ilaçlar, reperfüzyon tedavisi ve/veya antitrombotik tedavi seçenekleri, cerrahi ve kateter temelli koroner arter girişimleri ile perkütan koroner girişimler (percutaneous coronary interventions-PCI-PKG) gibi yöntemler bulunmakta olup bazı durumlarında koroner arter bypass greft cerrahisi (KABG-CABG) kullanılmaktadır.

2.2. Perkütan Koroner Girişim, Koroner Arter Bypass Greft ve Kardiyopulmoner Bypass

Koroner arterlerin tıkanma derecesi, farmakolojik veya cerrahi olmak üzere gerekli iki tedavi metodunu belirler (82). Günümüzde cerrahi tedavi yaygın olarak kullanılmakta olup bu tedavi PCI ile CABG arasında değişebilmektedir (83,84). Koroner anjiyoplasti olarak da bilinen perkütan koroner girişim; kararsız angina, AMI ve multidamar koroner arter hastalığı gibi obstrüktif koroner arter hastalığının tedavisinde kullanılan bir tekniktir. Daralmış veya bloke olmuş koroner arterlerin açılması için uygulanan PCI tipleri arasında balon anjiyoplasti ve stent kullanımı vardır. Perkütan koroner girişim kasık veya koldan bir atardamarın içine kateter ile girilerek koroner arterlere ulaşarak gerçekleştirilir. Bu kateterin ön ucunda, balon, stent veya kesici cihaz gibi çeşitli cihazlar (arterektomi cihazı) kullanılabilir. Kateter ve cihazlar arterin içinden koroner arter daralması veya tıkanıklığı alanına uzatılır. Tıkanıklık ya balon ya da stent ile açılmaya çalışılır (85). Eğer hastalar için perkütan koroner girişim tedaviyi sağlayamıyorsa hasta için CABG gündeme gelmektedir.

CABG'nin amacı; 1 mm'den daha büyük çaplı tüm şiddetli stenotik epikardiyal koroner arterlerin tam revaskülarizasyonunu sağlayarak koroner arterlerdeki kan arzını arttırmaktır (86). CABG; kalp üzerinde yapılan en yaygın cerrahi prosedür olup, dünya çapında her yıl milyonlarca operasyon gerçekleştirilmektedir. Son otuz yıldır multidamar KAH'lı hastalar için 'altın standart' tedavi olarak kalan CABG son yıllara kadar uzanan takip verileri ile en kapsamlı cerrahi prosedürdür (87). İskemik kalp rahatsızlığı semptomlarının hafifletilmesinde son derece etkili olan CABG daha şiddetli koroner arter hastalığı olan ve sol ventrikül fonksiyonları bozulmuş olan hastalarda yaşam beklentisini üst seviyelere çıkarmaktadır (88).

Çeşitli sebeplerden dolayı tıkanan koroner arterin cerrahi tedavisi olan CABG'de kanı koroner arter alanına yani tıkanmanın distaline yönlendirmek için greft (vasküler kanallar) amacıyla hastanın başka bölgelerindeki arterler veya venler alınarak kullanılabilir (89). Bu prosedürün amacı; sağkalımı iyileştirmek ve semptomları hafifletmektir (90). Bu müdahalenin ana kaygısı, kullanılan greftin tekrar tıkanma süresi ve işlevselliğidir. Bunu başarmak için, revaskülarizasyonun (yeniden kanlandırma) hastanın yaşamının tamamı veya çoğu için geçirgen kalacak kanallar kullanılarak tamamlanması gereklidir (91). CABG için çok çeşitli vasküler kanallar mevcut olup iç torasik arter (ITA), safenöz ven (SV), radial arter (RA), sağ gastroepiploik arter

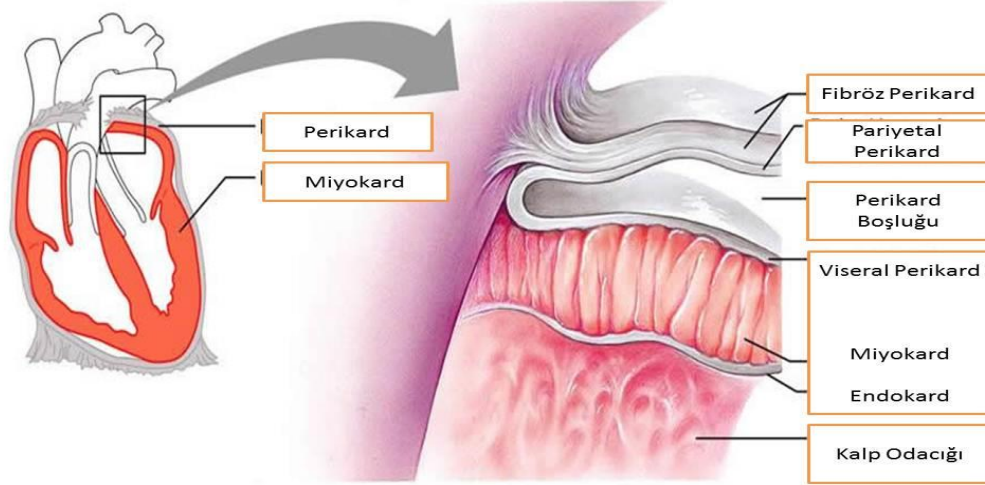
(RGEA), ulnar arter (UA), splenik arter ve inferior epigastrik arterler CABG için en sık olarak kullanılan greftlerdir (83). Bu türden seçenek çeşitliliği tartışmalara yol açmakta olup hangisinin daha iyi olduğu konusunda fikir birliğine varılamamıştır (92). CABG için greft seçimi hasta sağ kalımında en önemli faktördür (83,93). Bu seçim cerrahın tercihine, tecrübesine ve her hastanenin oluşturduğu cerrahi protokollere dayanmaktadır (94).

CABG’de cerrahi olarak Kardiyopulmoner bypass (KPB, CPB, On pump bypass), Pompa dışı CABG (Of pump bypass), Minimal invaziv doğrudan koroner arter cerrahisi (Minimally invasive direct coronary artery surgery) ve Robotik cerrahi yöntemleri kullanılmaktadır (95).

Kardiyovaskülcerrahide hastanın ve cerrahi işlemin durumuna göre vücut dışı dolaşımın (ekstrakorporal sirkülayon) sağlandığı kardiyopulmoner bypass yöntemi kullanılmaktadır. KPB, kalp ve büyük damarlarda ameliyatı kolaylaştırmak için dolaşım ve solunum desteğine sahip bir ekstrakorporal dolaşım şeklidir. KPB kalp ve akciğerleri köprüleyerek kansız bir ameliyat alanında ameliyat yapılmasına izin veren yapay bir dolaşım sağlar. İnsanda KPB yöntemi ilk kez 1952 yılında ilk atriyal septal defektin onarımı için John Gibbon tarafından yapılmıştır (96).

2.3. Perikardın Anatomisi ve Histolojisi

Perikard veya perikardiyum kapalı bir fibroseröz yapı şeklinde kalbin tamamını saran, kalbe gelen ve kalpten çıkan büyük damarların (aort, vena kavalalar, pulmoner damarlar vs.) giriş-çıkış kökünü (proksimal uçlarını) çevreleyen çift duvarlı kesedir (Şekil 2.2) (97). Büyük damarların çevresindeki perikardiyal uzantılar perikardı üstten tutmaktadır. Kalınlığı değişen perikardın tutunma yerleri olumna vertebralis, diyafragma, processus xiphoideus ve manibrium sternidir (98). Kalbe ve perikard boşluğuna bağlı olarak orantılı şekilde artan perikard kalınlığı insanda 1-3.5 mm, koyunda 0.32 ± 0.01 mm, domuzda 0.20 ± 0.01 mm’dir (99).

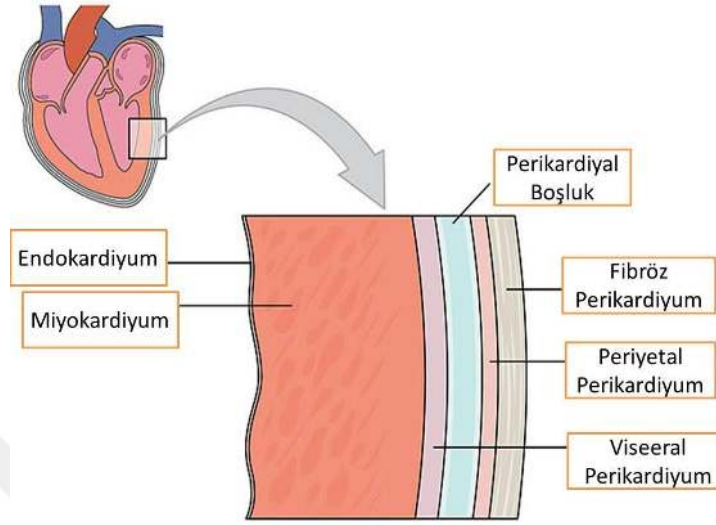


Şekil 2.2. Perikard anatomisi (97).

Perikardın en önemli mekanik özelliğinden birisi kalbin boşluklarının hacimlerini belli bir seviyede tutarak onları sınırlandırmasıdır (100). Kalp hacimlerini belli seviyede kısıtlayıcı olarak ayarlayan perikardın bu mekanik özelliği aslında silginin gerilme gücüne benzemektedir (101). Sempatik ve parasempatik uyarıya sahip olan perikarda kanın taşınması aortun küçük dalları, IMA (Internal Mamarian Arter) ve muskulofrenik arterlerle olmaktadır (102).

Perikardiyum; fibröz perikardiyum ve seröz perikardiyum olmak üzere iki yapıdan oluşmaktadır (Şekil 2.3). Fibröz perikardiyum dışta kollajen liflerinden, seröz perikardiyum ise iç kısımda mezotel hücrelerinden oluşur. Fibröz perikardiyum kalbi dış organlardan izole eder. Seröz perikardiyum fibröz perikardiyum ile miyokard arasındaki kısımdır. Seröz perikardiyum kendi içinde pariyetal perikardiyum ve visseral perikardiyum diye iki tabakaya ayrılır. Parietal perikardiyum ince bir tabaka olup fibröz perikardiyumla birleşmiştir. Parietal perikardiyum elastik ve kollajen liflerden zengin olan aselüler yapıya sahiptir. Kollajen lifler, perikardın sertliğinden sorumlu yapılardır. Normal sağlıklı kişilerde, perikard gerilimi azdır ve dalga şeklinde yerleşiklerdir. Gerilimin arttığı durumlarda kollajen lifler düzgün bir şekil alırlar ve dokunun sertliğini sağlarlar (103). İnce ve saydam bir zar olan visseral perikardiyum (epikard) ise, miyokardiyumun üstündeki tabaka olup miyokard üzerine sıkıca yapışık tek katmanlı bir epitel tabakasından oluşmaktadır. Visseral perikardiyum kalbin gevşeme ve kasılma hareketlerine göre düzleşmekte veya küp biçimini almaktadır. Visseral perikardiyum bol miktarda esnek lif içeren bağ dokusundan oluşmuştur. Epikard ve kalp kası arasında kalp kasının bağ doku stromasıyla bağlantılı olan başka

bir bağ dokusu katmanı daha vardır. Bu katmanın içinde kalbin yüzeyinden köken alan damarlar, sinirler, koroner damar oluğu ve koroner damarlar düzeyindeki yağ dokusu yer almaktadır.



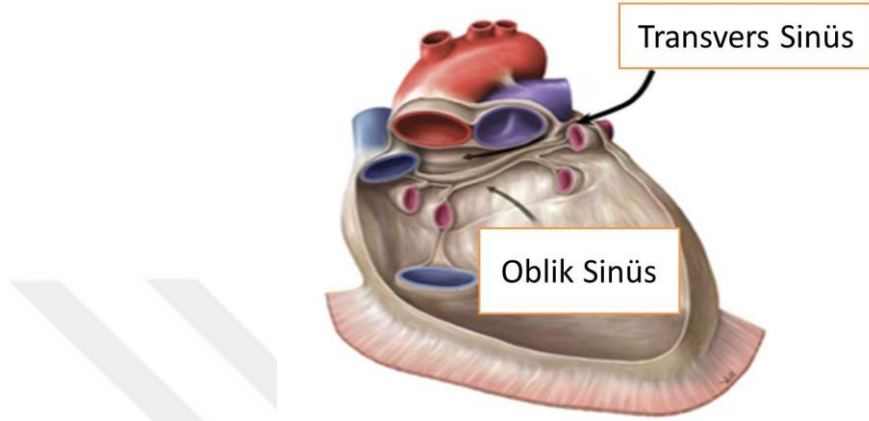
Şekil 2.3. Perikardiyum tabakaları (104).

Hem pariyetal hem de visseral perikardtaki birçok çalışma (insan, köpek, domuz) aynı mekanik özellikleri göstermiş olup aralarında sadece niceliksel farklılıklar ortaya çıkmıştır. Köpek pariyetal perikardtaki invitro çalışmalar viskoelastik tepkinin varlığını göstermekte olup, esasen bu durum elastik ve kollajen liflerin mevcudiyeti ve düzenlenmesini göstermektedir (105, 106). Pariyetal perikard ventriküler hacim modülasyonuna katılım, intraventriküler etkileşim ve ventriküler diyastolik basınç/hacim oranlarına katılımdan sorumludur (107). İnsan ve domuzlarda yapılan invitro epikardiyal çalışmalar bağ dokusunun bileşimi ve yönelimine atfedilen elastik özelliklerin varlığını kanıtlamıştır. Özellikle insan epikardiyumunun miyokardın pasif mekanik özelliklerine katkıda bulunduğu dair kanıtlar bulunmaktadır (108). Bu şekilde epikardın ventriküler end-diyastolik hacim kontrolüne katıldığı ispatlanmaktadır (109).

2.3.1. Perikardiyal sinüsler ve sinirler

Pariyetal perikard büyük damarların başlangıç kısımlarını sardıktan sonra visseral perikard şeklinde devam eder. Aslında visseral perikard pariyetal perikardın iç tabakasını oluşturarak devamlılık sağlar. Bu bölgelerde perikardiyal sinüsler (cepler) oluşur. Perikardın anatomisinde oblik ve transvers perikardiyal sinüslerdenilen iki sinüs vardır (Şekil 2.4). Transvers sinüs asandan aort ve ana pulmoner arterin arkasında

bulunur. Transvers sinüs kalbin arkasındaki venöz uç (sol atriyum ve üst vena kava) ile önündeki arteryel uç (aort ve pulmoner gövde) arasındaki geçiştir. Oblik sinüs ise kör boşluk şeklinde olup kalbin sağ omuza doğru kaldırılmasıyla görülmektedir. Oblik sinüsün sağ tarafında inferior vena kava vardır. PS kaynağının visseral perikard olduğuna inanılmaktadır.



Şekil 2.4. Transvers ve oblik perikardiyal sinüsler

Kalp odacıkları içinde sadece sol atriyum ekstraparikardiyal bir odacıktır. Oldukça iyi innerve olan perikard ayrıca mekanoreseptör, kemoreseptör ile frenik sinirleri de taşımaktadır. Perikard iki frenik sinir tarafından sinirlenir ve her bir sinir bir afferent dal (perikardiyal dal) verir (110, 111). Bu yapılar perikard iritasyonundan kaynaklandığı düşünülen reflekslerin oluşumunda ve perikarda ağrı uyarılarının taşınmasında rol almaktadır.

2.3.2. Perikardın gelişmesi

İntrauterin dönemde oluşan perikard; plöroperikardiyal membran ile diyaframı oluşturacak yapı olan septum transversumdan gelişmektedir. Bu dönemde meydana gelen gelişim hataları perikardın kısmi oluşmasına veya hiç oluşmamasına neden olmaktadır. Perikardın gelişim hatalarında perikardın hiç olmaması durumu daha çok görülmektedir. Kongenital olarak perikard defektli doğan olguların bir kısmında ayrıca başka organlarda da anomaliler görülebilmektedir (112).

2.3.3. Perikardiyal boşluk, perikardiyal sıvı ve içeriği

Seröz perikardiyumu oluşturan parietal ve visseral perikardiyum arasındaki boşluğa perikardiyal boşluk denir. Perikardiyal boşluk içerisinde dinamik değişiklikler gösteren

ve fizyolojik olan seröz PS bulunmaktadır. PS miktarı birçok kaynakta farklı miktarlarda tespit edilmiştir. Hacimsel çalışmalar, perikard sıvı hacminin hayvan boyutuna doğrudan benzer olduğunu göstermiştir. Örneğin tavşanlarda 0.4-1.9 mL, köpeklerde 0.5-2.5 mL PS var iken yetişkin insanlarda yaklaşık 20-60 mL (ortalama 15-35 mL) bulunmuştur (113, 114). PS miktarı ve içeriğiyle ilgili yapılan renklendirme çalışmalarına göre; perikardiyal boşluk içindeki sıvı dağılımı heterojen çıkmıştır. Yapılan araştırmalara göre en büyük PS miktarının özellikle de sırtüstü pozisyonda atriyoventriküler ve intraventriküler sulkus yani superior ve transversal sinusta olduğu tespit edilmiştir (98). PS'nin heterojen yapısına rağmen yine de PS'nin sürekli olarak karıştırıldığını gösteren bazı farmakokinetik çalışmalar vardır. Bu çalışmalar PS bileşiminin pozisyona bakılmaksızın aynı olduğunu söylemektedir (115).

Normal insan PS'sinin bileşimini tanımlamak zor olup mevcut veriler kardiyotorasik cerrahi hastalarından veya hayvanlardan elde edilmiştir. PS tıpkı plevra sıvısı gibi spesifik özelliklere sahip bir sıvıdır (116, 117). Hücre popülasyonu ile ilgili olarak insan normal PS'deki çalışmalar heterojen bir hücre popülasyonunun varlığını göstermiştir. PS içeriğinde mezotelyal hücreler, lenfositler (% 53), granulositler (% 31), makrofajlar (% 12), eozinofiller (% 1.7) ve bazofiller (% 1.2) vardır. Bu duruma göre PS'de "lenfositoz" durumu daima kritik öneme sahip olup lenfosit sayısı tüm hücre popülasyonunun % 60'ını aştığı zaman patolojik olarak karakterize edilmektedir (118, 119).

2.3.4. Perikardın ve perikardiyal sıvının önemli fonksiyonları ile fizyolojisi

Perikard kalbin etrafındaki yapılara yumuşak ve seröz bir kese ortamı sağlar. Kalbin rahatça hareket edebileceği bir ortam oluşturarak kalbin kasılması sırasında kayganlığı sağlayan perikardiyal mayii kalbin çalışmasını kolaylaştırır (120). PS'nin bunun dışında aşağıda belirtilen birçok önemli görevi bulunmaktadır.

- PS'nin ana fizyolojik rollerinden biri her atımda kalbin sürekli hareketini mümkün kılan epikardiyal yüzeyi yağlayarak perikard içinde uygun bir sürtünmeyi sağlamaktır (120, 121).
- Yerçekimi kuvvetinin kalp üzerinde eşit olarak dağılımını sağlayan perikard; miyokardın dayanaklılığını arttırarak kalbin üzerinde koruyucu bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar perikardı olmayan kalpte intrakardiyak basıncın 1 atmosfere çıkarılması ile miyokard rüptüre olurken; perikardı sağlam olan kalpte bu değerin 1.75 atmosfer olduğunu göstermiştir (122). Böylece

perikardın miyokard dayanıklılığını artırdığına dair önemli bir kanıt ortaya çıkmıştır.

- Kalbin orta mediastende sabit kalmasını sağlayan perikardta bağlayıcı ligamanlar kalbin torsiyonunu ve yer değiştirmesini engelleyerek vücut pozisyonundaki değişiklikler esnasında aşırı hareket etmesini önler (120).
- Ventriküller üzerinde hemodinamik etkiye sahip olan perikard kalp odacıklarının distansiyonunu sınırlar. Perikard yüksek end-diyastolik ventriküler basınç sırasında ventriküloatriyal kan retrogresyonunu (geri gitmesini) önler (120).
- Perikard kalbi bitişik anatomik yapılardan izole ederek hem yapışıklık oluşumunu önler hem de kalbin çevresinde bulunan yapılardaki enfeksiyonun kalbe yayılmasını önler. Örneğin akciğer, mediasten, özefagus ve plevra gibi komşu organ enfeksiyonları, inflamatuvar ve neoplastik durumlar PS'nin oluşturduğu fizyolojik bariyer sayesinde kalbe ulaşamaz (120).
- Sağ kalp boşlukları gibi ince duvarlı olan bölgeler için önemli olan aşırı dilatasyonu önler. Sol ventrikülün aşırı yüklenmesi durumunda sağ ventrikül impulsunu azaltır (120).
- Hidrostatik basınçların dağılımını dengeler. Negatif basınç sayesinde ventrikül sistolü esnasında intraperikardiyal basıncı düşürerek atriumlara kan akışını kolaylaştırır (101).
- Perikard mezotel hücrelerinden eikozanoidler ve prostoglandinler salgılanır. Böylece mezotel hücreleri miyosit yapısı, işlevi ve gen ifadesini etkilemektedir (123).
- Ventriküller arasındaki diyastolik coupling'i (bağlantı) sağlayarak, ventriküllerin diyastolik doluş esnasında birbirleriyle etkileşmesine neden olmaktadır.
- Sinir uyarımı tepkisi sayesinde kardiyak frekans ve arteriyal kan basıncının düzenlenmesine yardımcı olur.
- Diyastol sonu (end-diyastolik) basıncının tüm hidrostatik seviyelerde aynı kalmasını sağlayan bir hidrostatik kompanzasyon sistemi oluşturulmasını ve Frank Starling mekanizmasının fonksiyonel olmasını sağlar (117, 124).
- Bu fonksiyonlara ek olarak perikardın immünolojik, vazomotor ve fibrinolitik aktivitesi de vardır.

2.3.5. Hastalık halinde perikardın değişimleri

Perikard hem kardiyak hastalıklarda hem de sistemik bir hastalıkta karşımıza bir hastalık bulgusu olarak çıkabilmektedir. Kardiyak ve sistemik bir hastalıkta perikardın vereceği cevap akut inflamasyon ve/veya PS miktarındaki artış şeklinde olmaktadır (125). Aslında PS yıllarca hidrostatik basınç farkı ve ozmotik konsantrasyon gradiyenti ile üretilen plazmanın pasif ultrafiltratı olarak düşünülmüştür (126). Bununla birlikte, tavşanlarda ve köpeklerde yapılan çalışmalar, PS'nin içeriğini ve kompozisyonunun daha da fazla analizini sağlayarak bu basit görüşü genişletmiştir (118). İnsanlar üzerinde yapılan ilk geniş kapsamlı araştırmalardan birisinde elektif açık kalp ameliyatı geçiren 30 hastanın PS kompozisyonu ile ilgili ayrıntılı bilgi edinmiş ve küçük moleküllerin (üre, ürik asit, glikoz ve elektrolitler gibi) konsantrasyonlarının plazmada ve PS'de birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir (114).

PS'nin üretilmesi sadece filtrasyon işlemlerini değil aynı zamanda aktif mekanizmaları da içermektedir. Örneğin miyokard tarafından üretilen çeşitli biyolojik maddeler PS olarak birikmektedir. Yapılan birçok çalışmada PS içinde biriken maddeler arasında endotelinler (127), adenin nükleozidleri (128) ve anjiyotensin (129) tespit edilmiştir. Bu maddelerin plazma ile karşılaştırılması sonucunda PS'de daha yüksek konsantrasyonda olduğu ortaya çıkmıştır.

Perikardiyal sıvı ve serumda bulunan kardiyak markerleri kıyaslamak amacıyla yapılan bir çalışmada; açık kalp ameliyatına alınan 30 hastadan ameliyat sırasında median sternotomi insizyonundan sonra ve ameliyat bittikten 24 saat sonra göğüs tüpüne drene olan perikardiyal sıvı ve venöz kan alınarak her ikisinde de kardiyak troponin (cTn I), CK, CK-MB ve myoglobin seviyelerine bakılmış. CK kolorimetrik metodla ölçülürken, cTn I, CK-MB ve myoglobin ise enzim immünoassay tekniği ile ölçülmüş. Yapılan değerlendirme sonucunda perikardiyal cTnI seruma göre daha yüksek, CK, CK-MB ve myoglobin ise seruma göre daha düşük çıkmış olup; preoperatif perikardiyal sıvıda biriken cTnI miktarı subklinik hasarı yansıtabildiği sonucuna varılmıştır (9).

Mezotel hücreleri tarafından kandan filtre edilen ve fosfolipid ihtiva eden PS'nin elektrolit içeriği plazmaya yakın olup (pH=7.57, Na=138 mM, Cl=109 mM, K= 4,5 mM) protein içeriği (total protein 3.1 g/dL) ise plazmanın 1/3'ü kadardır (130). Tazı ve tavşanlarda yapılan bir çalışmaya göre Ca^{2+} (1.92 ± 0.04 mmole kgr H_2O^{-1}), Na^+ (150.5 ± 0.72 mmole kgr H_2O^{-1}), Cl^- (123.2 ± 0.71 mmole kgr H_2O^{-1}) ve Mg^{2+} (0.85 ± 0.09 mmole kgr H_2O^{-1}) konsantrasyon olarak hesaplanmıştır. Aynı çalışmada ayrıca PS'de K^+ konsantrasyonu (3.81 ± 0.07) plazmaya nazaran daha yüksek çıkmıştır. Bu durum sistol

sırasında miyokard interstisyumundan perikard boşluğa doğru K^+ sızıntısı olduğunu göstermektedir (117, 131). Protein içeriği plazmadan az olan PS'nin albümin düzeyi ise plazmaya göre nispeten daha fazladır. Yapılan başka bir çalışmaya göre PS osmomolaritesi ve protein (albümin, globulinler, makroglobülinler ve fibrinojen) konsantrasyonu plazmaya göre daha düşük bulunmuştur (131). PS içinde bulunan maddelerin net filtrasyon gradiyentleri göz önüne alındığında, normal PS'nin transüda olduğu ortaya çıkmaktadır (117, 131).

2.3.6. Perikardiyal hidrodinamik ve lenf drenajı

PS oluşumunda ayrıca perikardiyal boşlukta miyokardiyal interstisyel sıvı ve lenf drenajı önemli kaynaktır. PS'nin boşalması pariyetal perikard aracılığıyla torasik duktusa, sağ plevral aralıktan da sağ lenfatik duktusa drene olması sayesinde olmaktadır (132). PS'nin hacmi, üretim ile drenaj arasındaki denge ile belirlenir. PS'nin plazma ultrafiltrasyonu ile epikardiyal kılcal damarlardan (muhtemelen pariyetal perikardiyumdan) ve az miktarda miyokardtan interstisyel sıvı şeklinde türetildiğine dair güçlü kanıtlar vardır (133). Perikardiyal boşluğa akışkan drenajı esas olarak pariyetal perikard lenfatik kılcal yatak yoluyla olmaktadır (134). Koyunlarda yapılan çalışmaya göre PS'nin tümünün lenfatik kılcal yataktan 5-7 saatte bir drene olduğu belirlenmiştir (134). Bununla birlikte normal prosedürler ve koşullar altında PS dinamiğini inceleme zorluğu nedeniyle konu tam olarak aydınlatılamamıştır (135). Esasen perikardiyal tabakalar içerisindeki sıvı hareketi mikrovasküler yapı ile boşluk arasındaki hidrostatik/ozmotik basınç dengesine bağlıdır (134). Dinamik değişiklik gösteren ve fizyolojik bir sıvı olan PS içinde proteinler, sitokinler, hücreler, glukoz, elektrolitler, kolesterol, LDH, natriüretik faktörler, VEGF, FGF, hücre adezyon molekülleri (ICAM), prostaglandinler ve kayganlaştırıcı özelliği olan fosfolipidler bulunmaktadır (136, 137). PS'de ayrıca çeşitli yollarla buraya girmiş olan bakteri ve virüslerde bulunabilmektedir (138). PS hem küçük hem de bazı büyük moleküllere geçirgen olup, PS'de dinamik bir denge halinde olan serum ile serbest sıvı-elektrolit değişimi vardır (139). Yapılan bazı çalışmalarda kalp hastalıkları sırasında PS içerisinde bulunan maddelerin değişen konsantrasyonu bildirilmiştir (140). Buna ek olarak PS kompozisyonu çeşitli kalp hastalıklarında (141) ve kardiyak hipertrofide (142) değişmektedir.

2.3.7. Perikardiyal basınç

Intraperikardiyal basınç solunum siklusu boyunca -5 ile +5 mmHg arasında değişmektedir. Plevral basınca yakın olan intraperikardiyal basınç solunumla birlikte siklik değişiklikler göstererek inspirasyon sonunda yaklaşık -6 mmHg, ekspirasyon sonunda ise yaklaşık -3 mmHg olmaktadır. Sağ ve sol ventrikül diyastolik basınçlarından daha düşük olan intraperikardiyal basınç perikardiyal boşlukta toplanan sıvının volümüne, sıvının toplanma hızına ve perikardın fiziksel özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Santral venöz basınç intraperikardiyal basınçtan hafif derecede yüksek olup bu durum venlerden kalbe kan akımını sürdürmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre perikard yeni tedavi yöntemlerinin uygulama alanı haline gelmiştir. Özellikle perkütan girişim veya cerrahi revaskularizasyonun yapılamadığı hastalarda tıkalı damarlarda kollateral gelişimi uyarmak için perikardiyal boşluğa verilen intraperikardiyal "basic fibroblast growth factor" uygulamaları perikardı yeni tedavi girişim yeri ve metodu haline getirmektedir (143, 144).

2.3.8. Perikardiyal efüzyon

Perikardiyal efüzyon; perikardiyal boşlukta sıvı birikiminin komplikasyonudur. Perikardiyal boşlukta normalden daha fazla sıvının birikmesinde, bir çok sebep olabilmektedir. PS üretimi ve drenajıyla ilişki oluşan patolojiler sıvının normalden daha farklı olmasına neden olmaktadır. Örneğin; hidroperikardiyum sağ atrium basıncının artması, perikardın venöz ve lenfatik drenajının azalması sonucu meydana gelir. Perikardiyal efüzyon kalp yetmezliği, kalp kapak hastalığı ve miyokard infarktüsünde görülebilmektedir. PS'nin intraperikardiyal basınca etkisi sıvının volümüne, toplanma hızına ve perikardın gerilme derecesine bağlıdır. Perikardın katılığı (stiffness) sıvının birikim hızı ile parietal perikardın esneme kabiliyeti arasındaki etkileşim belirlemektedir. Sıvının yavaş toplandığı durumlarda 2 litreye kadar toplanan sıvı intraperikardiyal basıncı arttırmazken, sıvının hızlı toplandığı durumlarda toplanan 150-200 mL sıvı bile intraperikardiyal basıncı hızla arttırmakta ve sonuçta kalp tamponadına neden olabilmektedir. Böylece PS'nin birikme hızı klinik olarak verilen cevabı belirlemektedir (145).

Çoğunlukla perikardiyal efüzyonda inflamasyonlu perikardın geçirgenliği bozulmakta ve visseral perikarddan perikardiyal boşluğa fazla miktarda sıvı akımı olmaktadır. İrritatif ve inflamatuvar efüzyonlarda interlökinler, sitokinler ve tümör nekrozis faktör gibi bazı maddeler lokal olarak üretilmektedir. Perikardta geri emilimin bozulmasında

büyük moleküllerin ve proteinöz materyalin eksudasyonu ile intraperikardiyal trombüsün erimesi de rol oynamaktadır. Bu durum ise daha fazla sıvının birikimine neden olmaktadır (139). Geniş efüzyonlar çoğunlukla epikardta venöz ve lenfatik tıkanmadan sonra oluşmaktadır. Perikardiyal efüzyon asemptomatik durumdan, kardiyak tamponada kadar olan spekturumu çok geniş klinik bir durumdur.

2.3.9. Kalp tamponadı

Perikardiyal aralıkta sıvı birikimine bağlı olarak ortaya çıkan intraperikardiyal basınç artışının ventriküllerin diyastolik doluşunu kısıtlaması ve kalp debisinin düşmesi ile sonuçlanan klinik durumdur. Kardiyak tamponad; intrakardiyak basınçlarda artma, ventriküllerin diyastolik doluşunda, atım hacminde ve kardiyak outputta azalma ile karakterizedir (146). Kalp tamponadında önce sağ sonra sağ ventrikül doluşları engellenir. İntraperikardiyal basınç sol ventrikül diyastolik basıncına eşitlenince veya geçince bu durum ventrikül hacminde azalmaya, atım volümü ve kardiyak debide düşmeye sebep olur. Bu durum başlangıçta refleks taşikardi ile kompanse edilmeye çalışılır. Kalp tamponadının sebepleri arasında; enfeksiyon (viral, bakteriyel), malignite, travma, konnektif doku hastalıkları, üremi, MI sonrası kalp rüptürü, aort diseksiyonu, aort anevrizma rüptürü, antikoagülan tedavi, cerrahi işlemler, kateter komplikasyonları ve radyasyon gibi önemli etmenler bulunmaktadır. Tüm perikardit çeşitleri tamponad oluşturabilir (147). Kalp tamponadı hayatı tehdit eden, hızlı tanı ve acil tedavi gerektiren bir durumdur (148).

2.3.10. Perikardiyal sıvıda yapılan incelemeler

PS'de makroskopik ve mikroskopik incelemeler, hücrel sayım, biyokimyasal tetkikler, sitolojik, mikrobiyolojik-kültürel, inflamatuvar, patolojik, immünolojik, malignite ve moleküler (PCR, proteomiks vb) incelemeler yapılabilmektedir (149).

2.3.10.1. Perikardiyosentez

Perikardiyosentez sayesinde alınan sıvı örnekleri tetkik edilerek etiyolojik açıdan tanısal bir yaklaşım sergilenir. Perikardiyosentezde hasta yarı oturur pozisyona getirilerek perikardiyal efüzyonun ön ve alt kısımda birikmesi sağlanır. Bu yöntemde sol kosta yayı ile ksifoid çıkıntı arasından horizontal, frontal ve sagittal planlarda 45 derece açı ile sol omuza doğru ponksiyon yapılır. Perikardiyal ponksiyon işleminin floroskopi veya iki boyutlu ekokardiyografi (EKO) aracılığıyla yapılması gerekir (150). Floroskopi ve EKO sayesinde elektrokardiyografik ve hemodinamik kontrol sağlanmış olur.

Ponksiyon sırasında iğnenin ventrikül duvarına değmesi ile EKG’de ST segment yükselmesi gerçekleşerek ventriküler prematüre atımlar gözlenir. Eğer PS kesenin ön ve serbest boşluğunda ise kolaylıkla çekilir. Bir hastada uzun süreli drenaj gerekiyorsa o zaman perikard boşluğuna pigtail kateter adı verilen bir katater yerleştirilebilir. Pigtail kateter takıldıktan sonra kişide günlük drenaj 50 cc’nin altına düşerse bu durumda kateter geri çekilebilir (151). Floroskopi altında yapıldığında kontrast madde enjeksiyonu ile kardiyak boşluklara girilip girilmediği kontrol edilebilir. Aspirasyon sıvısı hemorajik ise pıhtılaşp pıhtılaşmadığı kontrol edilir.

2.3.11. Perikard tedavilerinin geleceği

Çeşitli kalp hastalıklarında bazı maddelerin PS’deki konsantrasyonları pek çok patofizyolojik mekanizmanın anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Örneğin yapılan bir çalışmada kalp yetersizliğinde atriyal natriüretik faktör ve brain natriüretik faktörün PS’de yaklaşık 12 kat fazla bulunması bu faktörlerin kalp yetersizliğinde otokrin ya da parakrin bir faktör olarak patofizyolojik bir rol oynadığını düşündürmektedir (152, 153). Kararsız anginada ICAM-I, VCAM-I, e-selektin gibi adezyon moleküllerinin ve interlökin 6 ve 8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin PS’deki yüksek düzeyleri koroner arter hastalıkları ile inflamasyon ilişkisini desteklemektedir. Yine bu hastalarda PS’de noradrenalin yüksekliği iskemik kalp kasında hasarlanma ve aritmilerin gelişiminden norepinefrinin sorumlu olduğu savını desteklemektedir. Sol ventrikül hipertrofisi ve remodeling oluşumundan sorumlu olduğu düşünülen angiotensin-II düzeylerinin bu hastaların PS’sinde düşük düzeyde bulunması kardiyomiyosit hipertrofisinden angiotensin-II’nin direkt sorumlu olmadığını düşündürmektedir. İskemik kalp hastalıklarında kollateral damar gelişimini uyardıkları bilinen asit ve basic fibroblast growth faktörler, vasküler endotelial growth faktör, hepatositik growth faktör gibi çeşitli anjiojenik faktörlerin perikardiyal konsantrasyonları anlamlı düzeyde artmış olması perikardı önemli kılmaktadır (152, 153).

2.4. mikroRNA’lar (miRNA)

Genom dizilemesinin şaşırtıcı sonuçları arasında; gelişmişliklerine göre yüksek yapılı canlıların çoğunun sahip olduğu protein kodlayan gen sayısının tek hücreli canlılardan daha az olması bulunmaktadır (154). Bu durumun açıklamasında iki önemli etmen vardır. Birincisi; aslında genomun karmaşık ve farklılığı protein kodlamayan bölgelerden kaynaklanmaktadır. İkincisi; memeli genomunun yaklaşık % 97’lik kısmı protein yerine kodlamayan RNA’lardan (ncRNA) bölgelerden oluşmaktadır. Genomun

geri kalan % 3'lük kısmı ise protein kodlayan mesajcı RNA'ları (mRNA) ifade eden bölgelerden oluşmaktadır. Daha önceleri sadece ürün şifrelerini depolayan ve DNA ile protein arasında basit bir taşıyıcı olarak görülen RNA'ya bakış açısı bu haliyle değişmiştir. Çünkü RNA'nın canlı gelişiminde önemli bir role sahip olduğu ve kilit bir molekül olduğu yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır.

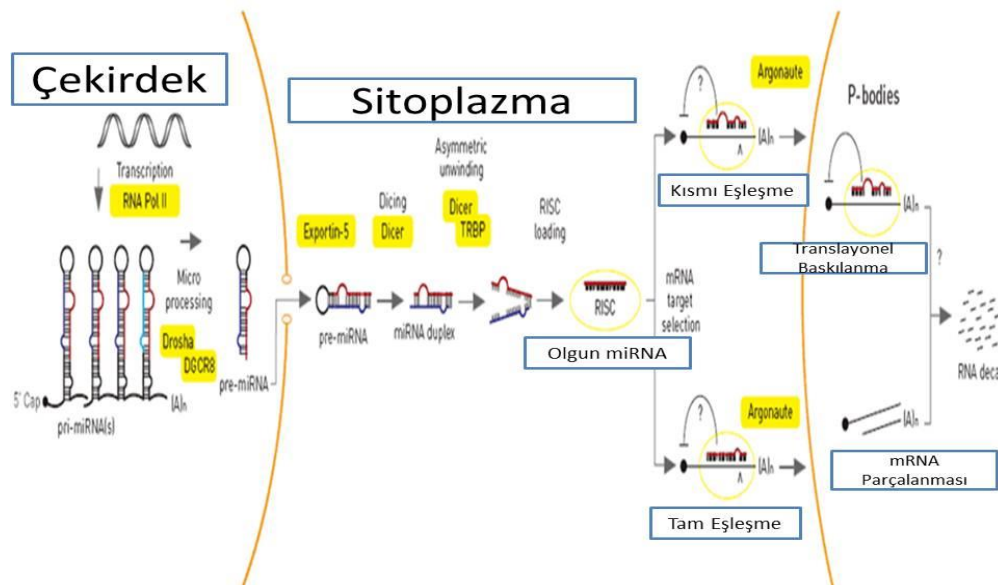
Canlı gelişiminde önemli bir rol oynayan ve kilit bir molekül olan mikroRNA'lar hücrelerin normal işlevinde, canlı gelişiminde ve biyolojik işlemlerde yer aldığı gibi kardiyovasküler hastalığı da içine alan birçok hastalıkla ilişkilidir (155). Günümüzde hedef mRNA'lara bağlanıp gen ifadesini düzenleyen birçok miRNA tanımlanmış olmasına rağmen miRNA'ların biyolojik işlevleri hakkında bilinenler tam anlamıyla yeterli değildir. Yapılan çalışmalarda hücrelerin farklılaşma, proliferasyon, metabolizma ve apoptozis gibi biyolojik işlevlerde miRNA'ların ifade seviyelerinin önemli olduğu ortaya çıkmıştır (156). Günümüzde miRNA'ların kanser, viral hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik bozukluklar gibi birçok hastalığın tanı ve prognozunda kullanılabileceği belirtilmiştir (18, 157). mikroRNA ilk defa 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından *C.elegans*'ın gelişiminin takibi sırasında tanımlanmıştır (158). miRNA'lar yapısal olarak 18-24 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan kısa ve tek iplikçikli RNA molekülleridir. Hedef mRNA'ya bağlanarak mRNA'ların yıkılmalarına ve translasyonel baskılanmasına sebep olan miRNA'lar gen ifadesinin post transkripsiyonel düzenlenmesinde rol oynarlar (159). Dokular arasında farklı şekilde ifade edilen miRNA'lar hücrede, hücre dışında, dolaşımda ve vücut sıvılarında bulunmaktadır. Dokuların, hücrelerin ve sıvıların kendine has miRNA'ları bulunabilmektedir (5). En son versiyon olan merkezi miRNA datası (V21.0) olan miRBase.org web sayfasına göre 223 türde toplam 35828 olgun miRNA, insanda ise 1881 prekürsör ve 2603 olgun miRNA ürünü bulunmaktadır (6, 160).

2.4.1. miRNA oluşumu ve işlenmesi

miRNA'lar birbirini takip eden üç aşamalı adımda meydana gelmektedir. Birinci adımda mikroRNA genlerinden pri-miRNA'ların (primer miRNA) transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lardan pre-miRNA (prekürsör miRNA) oluşur. Son adımda ise pre-miRNA'lardan olgun miRNA'lar oluşur (161, 162). Birinci ve ikinci aşama çekirdek içerisinde oluşurken, üçüncü aşama ise stoplazmada oluşur.

Az bir kısmı RNA polimeraz III tarafından kodlansa da çoğunlukla RNA polimeraz II enzimleri tarafından kodlanan mikroRNA'lar kendisini kodlayan genlerden önce birincil transkript (pri-miRNA=500-3000 baz) olarak yazılırlar (163, 164). Oluşan pri-miRNA'ların 5' (5 üssü) uçlarında 7 metil guanozin ve 3' (3 üssü) uçlarında ise poli adenozin (poly-A) kuyruğu vardır (20, 165). Bu yönüyle pri-miRNA'lar mRNA'lara benzemektedir. Tek zincirli olan pri-miRNA'lar kendi üstüne kıvrılarak saç tokası (hairpin) şeklini oluşturur. Pri-miRNA'lar mikroişlemci protein kompleks (Microprocessor complex) tarafından işlenerek hücre çekirdeğinde pre-miRNA olarak bilinen 70 nükleotid uzunluğunda, sap-ilmik şeklinde, öncül (prekürsör) yapılar dönüşmektedir. Mikroişlemci kompleks'te RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazi olan Drosha ve kofaktörü Pasha (DGCR8-DiGeorge critical region 8) adlı çift iplikli RNA bağlayıcı protein bulunur (166). Bu işlemler çekirdekte yapılmaktadır (167). Çekirdekteki işlemiden sonra pre-miRNA nükleus porlarından sitoplazmaya nükleer transport reseptör olan eksportin-5 ve RAN GTP aracılığıyla taşınır.

Stoplazmaya gelen pre-miRNA'lar daha sonra Dicer adlı endonükleaz ve TRBP (RNaz 3 enzimi olan ve çift iplikli RNA'ya bağlanan bir protein) ile etkileşerek olgun miRNA'ya (22 nükleotitlik çift iplikli miRNA) dönüşürler (Şekil 2.5). Bu işlem sırasında Dicer RNA-indüklenmiş susturma kompleksi olan (RNA-induced silencing complex) RISC oluşumunun başlatır. RISC miRNA ifadesi ve RNA interferanstan (RNAi) kaynaklanan gen susturmasından sorumludur.



Şekil 2.5. miRNA oluşum aşamaları (168).

Pre-miRNA'nın düzgün bir şekilde işlenmesi için, sap-ilmik yapısında hem 5' hem de 3' ucunda tek iplikli RNA uzantılarına sahip olması gerekir. İşlenmenin gerçekleşebilmesi için bu tek iplikli RNA motiflerinin uzunlukları önemlidir.

Dicer tarafından sap-ilmliğini kesilen pre-miRNA'dan iki tamamlayıcı kısa RNA molekülü meydana gelir. Meydana gelen iki iplikten 5' ucu daha kararlı olan seçilerek argonaute (Ago) yardımıyla RISC kompleksine dahil olur. RISC'e dahil olan ipliğe kılavuz iplik (guide strand) adı verilir. RISC'e dahil olmayan ipliğe ise anti-kılavuz (yolcu iplik) adı verilerek bu iplik RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. Ago RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNaz'dır. miRNA'lar RISC kompleksine dahil olduktan sonra tamamlayıcı oldukları mRNA ile baz eşleşmesi yapar. miRNA ve mRNA baz eşleşmesinden sonra argonaute (Ago) proteinleri mRNA'yı yıkar. Yani olgun miRNA'nın termodinamik özelliklere göre önce çift iplikten biri seçiliyor, sonrasında Ago ve RISC kompleksi olaya dahil olarak komplementer mRNA'nın transkripsiyon sürecini baskılayarak veya mRNA'yı parçalayarak inhibe ediyor (169, 170).

miRNA'lar bir veya daha fazla mRNA'ya komplementerdir. Tek bir miRNA 200 hedef bölgeye bağlanma özelliğine sahiptir. miRNA'lar genelde mRNA'nın 3' UTR (untranslated region) bölgesine tamamlayıcıdır. Bazı miRNA'lar ise mRNA'nın 5' UTR bölgesi, ORF (open reading frame) bölgesi veya promotör bölgelerine bağlanarak görev yapmaktadır (165, 171).

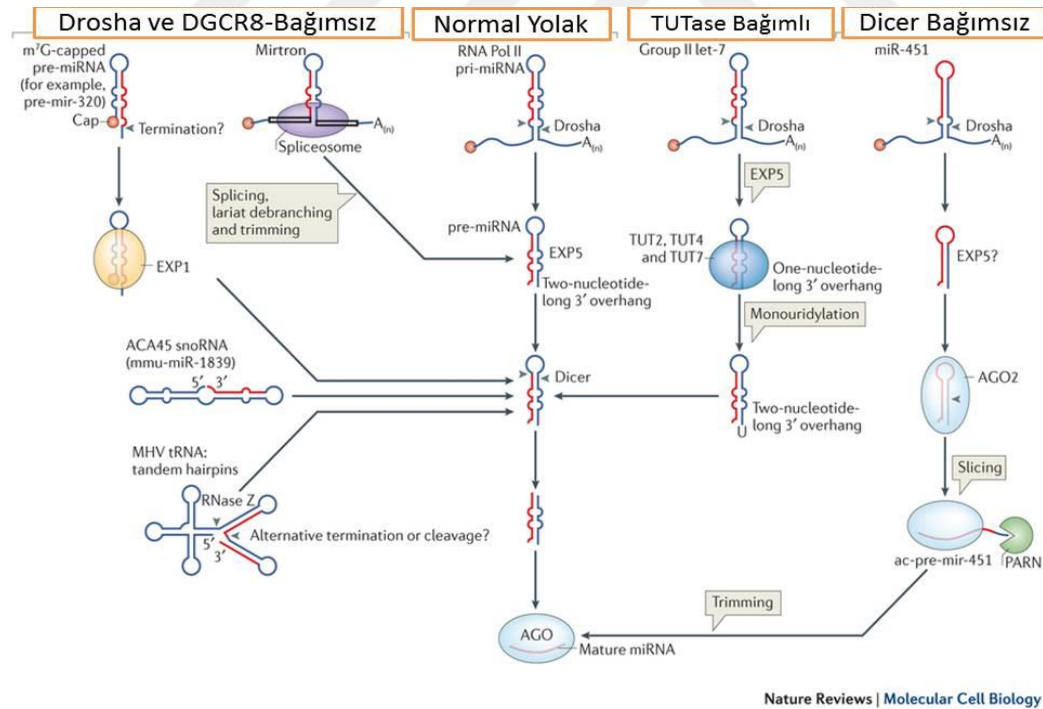
Olgun miRNA'lar, hedeflediği mRNA'lara kendi 5' ucundaki 2 ve 8. nükleotidler arasındaki 6 nükleotidlik komplementer sekansları aracılığıyla bağlanmaktadır. miRNA'ların bu bölgesine "çekirdek dizisi" yada "seed" denir. miRNA'nın hedef mRNA'yı baskılaması için çekirdek dizi bölgesindeki tamamlayıcı (komplementer) sekansı yeterli olup bu durum birçok çalışmada gösterilmiştir (165).

miRNA'ların 2-8 nükleotid uzunluğundaki "çekirdek dizisi-seed" hedef mRNA'ya tam komplementer olduğu için bu bölge çok önemlidir. miRNA'nın 6 nükleotidlik "çekirdek dizisi-seed" bölgesinin mRNA ile komplementer olma durumuna göre 4 farklı bağlanma tipi oluşmaktadır (172).

- **6mer site:** Sadece çekirdek dizisi bölgesindeki 6 nükleotidlik eşleşme olması durumudur.

- **7mer-A1 site:** Çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesinin yanında miRNA'nın birinci nükleotidinin karşısında A nükleotidinin olması durumudur.
- **7mer-m8 site:** Çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesine ek olarak miRNA'nın 8. nükleotidinde de eşleşme olması durumudur.
- **8mer site:** Çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesine ek olarak miRNA'nın 8. nükleotidinde eşleşme ve 1. nükleotidinin karşısında A nükleotidinin olması durumudur (172, 173).

Aynı genomik lokuslardan (<10 kb) doğan mikroRNA'lar miRNA kümeleri (MicroRNA clusters) olarak tanımlanırken, miRNA aile (MicroRNA family) üyeleri ise hedef özgünlüğü sağlayan 5' çekirdek dizilerini paylaşırlar. Yukarıda bahsedilen miRNA yollarının tipik yolları dışında ayrıca atipik yollarda tanımlanmıştır. miRNA'ların atipik yolları henüz tam olarak belirlenememiştir. Drosha bağımsız ve Dicer bağımsız yollara ayrılan atipik yollarda en çok bilinen yolak mirtron yolağıdır (Şekil 2.6). Yapılan çalışmalarda son zamanlarda mirtron yolağına benzer birçok atipik yolak keşfedilmiştir (171).



Şekil 2.6. miRNA oluşum yolları (171).

İlk kez D. Melanogaster ve C. Elegans'ta tespit edilen mirtron yolağı memeliler dahil birçok canlıda vardır (Tablo 2.1) (171, 174, 175). Mirtron yolağının öncülleri normal pri-miRNA'lara nazaran daha kısadır (176).

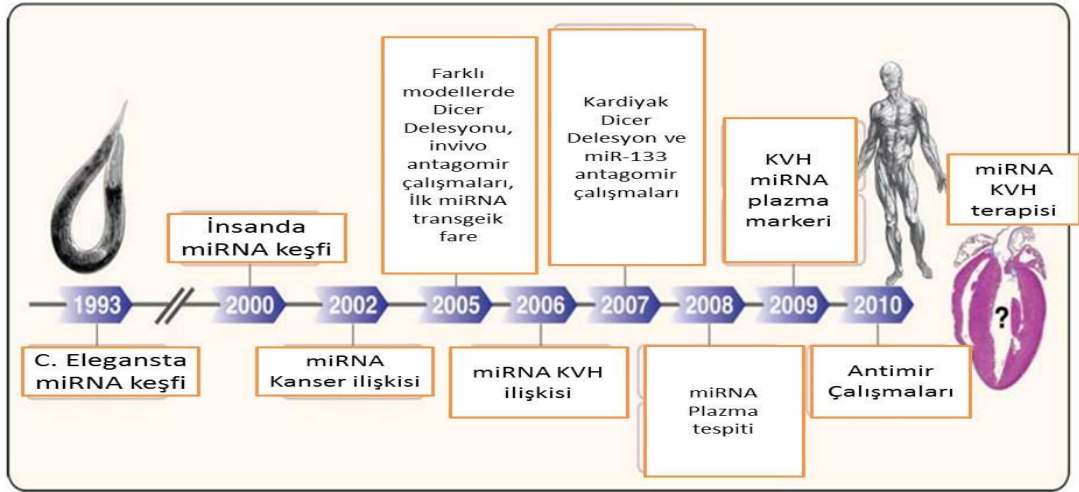
Tablo 2.1. Farklı türlerde tanımlanmış Mirtron tipleri (177).

Organizma Türü	Tür	Mirtron'lar	Kuyruklu Mirtron'lar
Omurgasızlar	<i>C. elegans</i>	miR-62	
	<i>Drosophila</i>	miR-1003, 1004, 1010	miR-10-17
Bitki	Pirinç	miR-1429.2	
Memelilerde	Fare	miR-877, 1224, 708, 1981	miR-1982
	Sıçan	miR-877	
	İnek	miR-877	
	Makak	miR-877, 1224, 1226, 1227, 1230, 1232, 1235, 1239, 1240, 1241	
	Şempanze	miR-877, 1224, 1225, 1226	
	İnsan	miR-877, 1224, 1225, 1226, 1227, 1228, 1229, 1231, 1233, 1234, 1236, 1237, 1238	

Günümüzde 4000 den fazla tanımlanmış miRNA geni bulunmaktadır. miRNA'ların yaklaşık % 30-50'si protein kodlayan genlerin intron kısımlarından kodlanırken geriye kalan miRNA'lar intergenik bölgelerden kodlanmaktadır (20). Memeli transkriptinin % 60'ından fazlası miRNA'ların kontrolündedir (19, 20).

Hücreler arası matrikste ve vücut sıvılarında da bulunan miRNA'lar birçok hastalıkla ilişkili olarak hastalığın tanısı, prognozu ve tedavisinde kullanılabilmektedir (178). miRNA'larla ilişkili hastalıkların tanı ve tedavisinde; tam kan, serum, tükürük, beyin-omurilik sıvısı (BOS), plevral efüzyon, göz sıvısı, süt, safra, idrar, karın zarı sıvısı, nazal sekresyon, ovaryen folikül sıvısı ve feçes gibi biyolojik ve doku sıvısı kullanılabilmektedir (19, 22, 23, 24, 179).

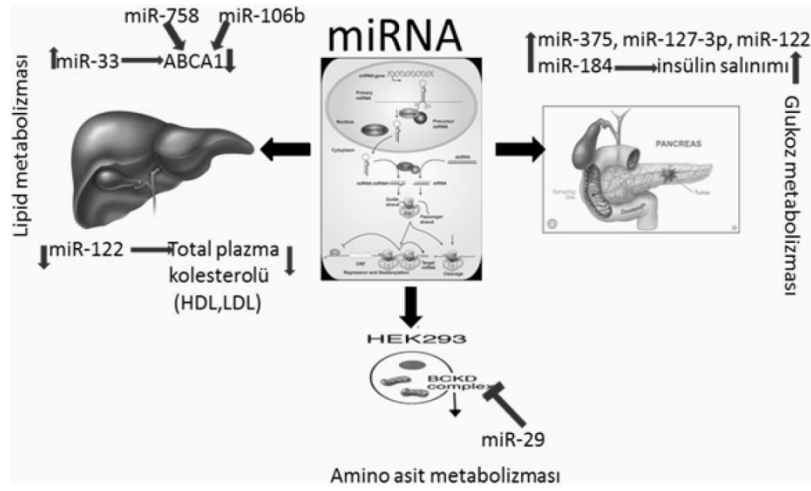
miRNA'ların taşınması; mikroveziküller (MPv= exomes, mikropartikül ve apoptotik body), Argonaute 2 (Ago 2), HDL lipoprotein ve nükleophosmin (NPM1) gibi proteinlerle olmaktadır. Bu şekildeki taşınım miRNA'ları stabil kılarak ribonükleaz aktivitesine karşı yıkılmalarını önlemektedir. Bu durum miRNA'ların kararlılığını artırdığından dolayı uzak bölgelere taşınarak o bölgedeki hücrelerin gen ifadesine etki etmesine neden olmaktadır. Böylece taşınan miRNA'lar hücreler arası iletişimde rol oynamaktadır (6). Sirküle olan bu miRNA'lar moleküler teşhis ve tedavi için biyobelirteç olma yönünde hızlı gelişmeler kaydetmektedir (Şekil 2.7) (180).



Şekil 2.7. miRNA'ların yıllara göre gelişerek tespit edilme süreçleri (181).

Dokuya özel gelişimlerde rol alıp hedef genlerde düzenleme yapabilen miRNA'lar kardiyovasküler hastalıklarda farklı düzeylerde olup cTnI gibi önemli kardiyak belirteçlere göre daha hassas bilgiler vermektedir (6). Akut miyokardiyal infarktüs (AMI) hastalarının dolaşımında 259 miRNA'nın değerlendirilmesi sonucunda miR 1, 133a ve 133b gibi miRNA'lar cTnI'dan daha önce pik yapmıştır. Bundan dolayı kardiyovasküler hastalıkların teşhisinde miRNA'lar biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (180). Feng Wang ve ark. tarafından yapılan çalışmada KAH'ta miRNA 133a için teşhis doğruluk değeri 0,918 çıkarken, cTnI için doğruluk değeri 0,741 çıkmıştır (6). Fakat bu miRNA'lar sadece kalpte değil aynı zamanda iskelet kasında da ifade edildiğinden bu durum miRNA'ların özgünlüğünü olumsuz yönde etkilemektedir.

miRNA'ların metabolizmada ana düzenleyici olduklarına dair birçok çalışma mevcuttur (Şekil 2.8). İlk olarak 2003 yılında *Drosophila*'da yapılan bir çalışmada miR-14'ün lipid metabolizmasında önemli işlevinin olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada miR-14'ün inhibisyonu sonucunda total vücut TAG (triasilgliserol) miktarının iki katına çıktığı ortaya çıkmıştır (182). Yapılan başka çalışmalara göre miRNA'lar lipid ve amino asit metabolizması ile glukoz düzenlenmesinde aktif rol oynamaktadır (183, 184, 185).



Şekil 2.8. Metabolizmada etkili olan bazı miRNA'lar (177).

miRNA kodlayan genler tıpkı protein kodlayan genlere benzer şekilde epigenetik mekanizmanın kontrolü altındayken, bazı miRNA'lar ise epigenetik mekanizmada rol oynayan faktörleri düzenlemektedir (186, 187). Kardiyovasküler sistemde miRNA'nın kritik rolü miRNA'yı işleyen DİCER enziminin inaktive edilmesi ile belirlenmiş olup; bu durum anjiyogenezis, damar oluşumu ve kardiyak gelişimde defektler ile ortaya çıkmıştır (4). Belirlenen bazı durumlara rağmen KAH için majör risk faktörü olan ve birçok parametre üzerine etkisi olan miRNA'ların ST2 üzerine etkisi henüz açığa kavuşturulamamıştır.

Suvi M. Kuosmanen ve ark. tarafından 51 hastayı kapsayan çalışmada PS'de 742 miRNA taranmış ve ortalama her bir örnekte 256 miRNA tespit edilmiştir (21). Çalışmada PS için 6 spesifik (özgü) miRNA (let 7d-3p, miR 34a-5p, miR 99b-5p, miR 125-5p, miR 320b ve miR 497-5p) tespit edilmiştir. Aynı çalışmada miR 7b-5p, miR 16-5p, miR 21-5p, miR 125b-5p ve miR 451a'nın tüm hastalarda en fazla bulunan miRNA'lar olduğu, miR-26b-5p, miR 29b, miR 125, miR 320, miR 34, miR 497 gibi miRNA'ların ise tüm sıvılarda ortak bulunduğu tespit edilmiştir. İlgili çalışmada bu sonuçlar elde edilmesine rağmen bulunan bu miRNA'ların kardiyak patolojiler açısından anlamı tespit edilememiştir. Tespit edilen bu miRNA'ların kardiyak hücreler arasında iletişimde rol oynadığı tahmin edilmiştir (25). Suvi M. Kuosmanen ve ark. tarafından yapılan çalışmada PS'ye özgü olan 6 miRNA (let 7d-3p, miR 34a-5p, miR 99b-5p, miR 125-5p, miR 320b ve miR 497-5p) hastaların tamamında (% 100'e yakın) bulunmuştur. Tespit edilen bu miRNA'ların Cp (Average Cp- Assay Cp) değeri; miR-125b-5p için 5.1, miR-320b için 3.5, miR-34a-5p için 2.3, miR-497-5p, miR-99b-5p ve

let-7d-3p için 0.8 bulunmuştur. Aynı çalışmada miR 21-5p PS'ye özgü olmamasına rağmen tüm hastaların PS'sinde en yüksek çıkan miRNA olmuştur (21).

KAH'ta ST2 ve miRNA araştırmaları ayrı ayrı yapılmış olmasına rağmen aralarındaki ilişki hakkında çalışmalar yapılmamıştır. Bu konuda sadece IL33 ile ST2 arasında bir etki olduğu ve miRNA'ların bu süreçte sadece inflamatuvar yanıtta rol oynadığıyla ilgili çalışma vardır (17).

KAH için tedavi seçenekleri arasında en son çare olan koroner bypass ameliyatları kalp krizi sonrası bazen acil olarak ilk seçenek olmaktadır. Ameliyatın gerçekleştirilmesi için hasta kanının vücut dışında sirküle olmasını sağlayan kardiyopulmoner bypass yöntemi faydalı etkisinin yanında hastaya birçok yönden zarar vermektedir. Bu zararlardan kurtulabilmek için KAH oluşum mekanizmasında miRNA ve ST2 rolü önemli olup, bu açıdan olayın çözülmesi hastalığa karşı tedavi seçeneklerini ortaya çıkaracaktır. Bu nedenle korunma ve tedavi için etkili yolların bulunması ve hedefe yönelik moleküllerin keşfedilmesine yönelik çalışmalara büyük ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda KAH ile ilgili yapılan çalışmalarda hastalıktan primer korunma araştırmalarına ilgi artmıştır. Bu konuda yapılan araştırmalar KAH insidansını azaltmada büyük öneme sahip olmaktadır. KAH tedavisinde birçok önemli ilerleme kaydedilmesine karşın hedefe yönelik tedavilerin başarısı için sebeplere yönelik adımların atılması gerekmektedir. Çünkü faydalı bir tedavi uygulamasından önce sebeplerin belirlenmesi önemlidir.

KAH'den korunmada ve tedavide birincil amaç, tespit edilmiş risk faktörleri ve sebeplerden kaçınmak, ikincil durumda ise hastalık oluşumunda yeni faktörlerin tespit edilmesidir. Tam da bu sebeple KAH için miRNA ve ST2 hastalık oluşumunda etkin olan yeni faktörler arasındadır. Hastalıkların tedavisine yönelik olarak günümüzde miRNA mimikleri ve antagonistleri sentezlenerek yeni yöntemler geliştirmeye çalışılmaktadır. Yapay mimik miRNA ve miRNA antagonistlerin tıpkı asıl miRNA'lar gibi etki göstererek hedef mRNA'ya bağlandığı, mRNA'yı inhibe ettiği veya parçaladığı birçok çalışmada ispatlanmıştır (188, 189).

2.4.2. Çalışmada kullanılan miRNA'ların (miR-125b-5p, miR-320b, miR-34a-5p, miR-16-5p, miR-320a ve miR-15a-5p) seçilme nedenleri

Yaptığımız araştırmalarda PS'ye özgü olarak bulunan miRNA'lardan (21) ST2'ye komplementer olup 7mer ve 8merlik bölgelerden bağlanarak ST2'yi hedefleyen altı miRNA (miR-125b-5p, miR-320b, miR-34a-5p, miR-16-5p, miR-320a ve miR-15a-5p)

tespit edilmiştir. Bu bilgilere miRNA'ların biyolojik hedeflerini tespit edebilen "http://www.targetscan.org/" ve "http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php" veri tabanlarından ulaşılmıştır.

PS'ye spesifik olan miR-125b-5p, miR-320b, miR-34a-5p daha önce HF veya diğer kardiyovasküler koşullarla ilişkilendirilmiştir (21). Örneğin; miR-125b, miR-320b ve miR34a-5p AMI ile ilişkili olup, bu mikroRNA'lar hastalığın oluşumu, patogenezi ve mortalite riskini etkilemektedir (190, 191, 192, 193). miR-125b, miR-320b ise ateroskleroz ve koroner arter hastalığı gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (190, 194, 195). Suvi M. Kuosmanen ve ark. tarafından yapılan çalışmada tüm PS örneklerinde yüksek miktarda tespit edilen miR-34a-5p, kardiyak fonksiyonda yaşlanmayla ilgili düşüşe katkıda bulunan bir faktör olarak tanımlanmıştır (196, 197). Aynı çalışmada buna ek olarak, tüm perikard sıvı örneklerinde yüksek miktarda tespit edilen miR-320a hakkında kalp yetmezliğinde biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (198, 199).

2.4.2.1. miR-320b

miR-320b Suvi M. Kuosmanen ve ark. tarafından yapılan çalışmada kalp yetmezliğinden dolayı açık kalp cerrahisine alınan hastaların % 96'sında PS'ye özgü mikroRNA olarak tespit edilmiş olup, 3.5 Average Cp- Assay Cp miktar değeriyle en çok bulunan 2. mikroRNA olmuştur (21). miR-320b hakkında yaptığımız microRNA target interaction database (miRNA hedef etkileşim veritabanı) araştırmalarına göre miR-320b'nin ST2'ye % 39-48 oranında 7mer-1A'dan bağlanabildiği (Şekil 2.9) tespit edilmiştir (200).

Position 649-655 of IL1RL1 3' UTR	5' ...UGGGGACACCUCAGG--AGCUUUAC...	7mer-1A
hsa-miR-320c	3' UGGGAGAGUUGGGUCGAAAA	
Position 649-655 of IL1RL1 3' UTR	5' ...UGGGGACACCUCAGG--AGCUUUAC...	7mer-1A
hsa-miR-320a	3' AGCGGGAGAGUUGGGUCGAAAA	
Position 649-655 of IL1RL1 3' UTR	5' ...UGGGGACACCUCAGG--AGCUUUAC...	7mer-1A
hsa-miR-320b	3' AACGGGAGAGUUGGGUCGAAAA	

Şekil 2.9. miR-320b ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi

2.4.2.2. miR-34a-5p

miR-34a-5p hakkında Suvi M. Kuosmanen ve ark. tarafından yapılan çalışmada kalp yetmezliğinden dolayı açık kalp cerrahisine alınan hastaların % 100'ünde PS'ye özgü mikroRNA olarak tespit edilmiş olup, 2.3 Average Cp- Assay Cp miktar değeriyle en

çok bulunan 3. mikroRNA olmuştur (21). Aynı çalışmada miR-34a-5p ayrıca tüm PS örneklerinde bulunmuş olup, en çok bulunan 50 mikroRNA arasında 2.3 Average Cp- Assay Cp miktar değeriyle 11. sırada yer almıştır. miR-34a-5p hakkında yaptığımız microRNA target interaction database araştırmalarına göre miR-34a-5p'nin ST2'ye % 57-72 oranında 7 mer-m8'den bağlanabildiği (Şekil 2.10) tespit edilmiştir (200). Birçok çalışmada AMI ile ilişkili bulunan miR34a-5p kardiyak fonksiyonda yaşlanma ile ilişkili azalmaya katkıda bulunan bir faktör olarak tanımlanmıştır (21).

Position 2461-2467 of IL1RL1 3' UTR	5' ...CAGCCUGCCCACUCACACUGCCC...	
hsa-miR-34a-5p	3' UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU	7mer-m8

Şekil 2.10. miR-34a-5p ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi

miR-34a-5p hakkında yaptığımız bir diğer araştırmalarına göre miR-34a-5p miRtarbase veri tabanına göre KAH ile ilişkili (Şekil 2.11) bulunmuştur (201).

miRTarBase		
Search By Disease Keyword: Coronary artery disease		
Disease	miRNAs	Number of miRNAs
Coronary artery disease	hsa-mir-1-1, hsa-mir-1-2, hsa-mir-122, hsa-mir-126, hsa-mir-130a, hsa-mir-134, hsa-mir-181a-1, hsa-mir-181a-2, hsa-mir-196a-2, hsa-mir-198, hsa-mir-21, hsa-mir-221, hsa-mir-222, hsa-mir-340, hsa-mir-34a , hsa-mir-370, hsa-mir-499a, hsa-mir-624, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2	20

Şekil 2.11. mir-34a-5p'nin KAH ile ilişkisi

2.4.2.3. miR-125b-5p

Yapılan araştırmalarda kalp yetmezliğinden dolayı açık kalp cerrahisine alınan hastalarda miR-125b-5p PS'ye özgü mikroRNA olarak tespit edilmiş olup, 5.1 Average Cp- Assay Cp miktar değeriyle % 98 oranında en çok bulunan 1. mikroRNA olarak kayda geçmiştir (21). Aynı çalışmada miR-125b-5p ayrıca tüm perikard sıvı örneklerinde en çok bulunan 5 mikroRNA arasına girmiş olup, kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. miR-125b-5p hakkında yaptığımız microRNA target

interaction database araştırmalarına göre miR-125b-5p'nin ST2'ye % 67 oranında 7mer-m8 çekirdek dizisinden ( ekil 2.12) bağlanabildiği tespit edilmiştir (200).

Position 1997-2003 of IL1RL1 3' UTR	5' ...UUACACUCAUCACUCCAGGGG...	
hsa-miR-125b-5p	3' AGUGUUCAAUCCAGAGUCCCU	7mer-m8

Şekil 2.12. miR-125b-5p ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi

2.4.2.4. miR-16-5p

Kalp yetmezliğinden dolayı açık kalp cerrahisine alınan hastalarda yapılan araştırmada miR-16-5p tüm PS numunelerinde tespit edilmiş olup, en çok bulunan beş miRNA arasına girmiştir (21). Aynı çalışmada miR-16-5p ayrıca 50 miRNA arasında 3.5 Average Cp- Assay Cp miktar değeriyle beşinci olmuş ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. miR-16-5p hakkında yaptığımız microRNA target interaction database araştırmalarına göre miR-16-5p ST2'ye % 83 oranında 7mer-8m çekirdek dizisinden bağlanabildiği ( ekil 2.13) tespit edilmiştir (200).

Position 172-178 of IL1RL1 3' UTR	5' ...UGCUGGGAGCUUCUCUGCUGCUU...	
hsa-miR-16-5p	3' GCGGUUAUAAUAGCAGCAGCAU	7mer-m8

Şekil 2.13. miR-16-5p ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi

2.4.2.5. miR-320a

Suvi M. Kuosmanen ve ark. tarafından yapılan araştırmada kalp yetmezliğinden dolayı açık kalp cerrahisine alınan hastaların tümünün perikard sıvısında miR-320a tespit edilmiştir (21). Aynı çalışmada miR-320a ayrıca 50 miRNA arasında 3.8 Average Cp- Assay Cp miktar değeriyle ikinci olmuş ve kalp yetmezlik biyobelirteci olarak tanımlanmıştır. miR-320a hakkında yaptığımız 'microRNA target interaction database' araştırmalarına göre miR-320a ST2'ye % 39-48 oranında 7mer-8m çekirdek dizisinden bağlanabildiği ( ekil 2.14) tespit edilmiştir (200).

Position 1846-1852 of IL1RL1 3' UTR	5' ...UGUUGUCUUGGAAACAGCUUUC...	
hsa-miR-320a	3' AGCGGGAGAGUUGG--GUCGAAAA	7mer-m8

Şekil 2.14. miR-320a ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi

2.4.2.6. miR-15a-5p

miR-15a-5p hakkında yapılan araştırmada kalp yetmezliğinden dolayı açık kalp cerrahisine alınan hastaların tümünün perikard sıvısında miR-15a-5p tespit edilmiştir (21). Aynı çalışmada miR-15a-5p ayrıca 50 miRNA arasında 3.3 Average Cp- Assay Cp miktar değeriyle yedinci olmuştur. miR-15a-5p hakkında yaptığımız microRNA target interaction database araştırmalarına göre miR-15a-5p ST2'ye % 82 oranında 7mer-8m çekirdek dizisinden bağlanabildiği (Şekil 2.15) tespit edilmiştir (200).

Position 172-178 of IL1RL1 3' UTR	5' ...UGCUGGGAGCUUCUCUGCUGCUU...	
hsa-miR-15a-5p	3' GUGUUUGGUAUACACGACGAU	7mer-m8

Şekil 2.15. miR-15a-5p ve ST2'nin çekirdek dizisi bölgesindeki nükleotid eşleşmesi

2.5. ST2 (Growth Stimulation Expressed Gene 2- İnterleukin 1 Receptor Like1 (IL1RL1))

İnterlökinler (IL) kardiyak yeniden modelleme (remodeling) oluşumunda etkin olup, proinflamatuvar süreçte kardiyomiyosit ve fibroblastlar arasında sinyal molekülleri olarak görev alarak kardiyoprotektif etki göstermektedir. Özellikle IL33'ün sitokin ve transkripsiyonel özellikli nükleer faktör olarak davranabilmesi hücreler arasında sinyal oluşturmakta ve kalbi korumaya yardımcı olmaktadır (7, 10). IL 33'ün başlattığı süreçte önemli roller oynayan ST2'nin growth stimulation expressed gene 2, interleukin 1 receptor like 1, IL1RL1, T1, Fit1, IL33R, DER4 gibi farklı isimleri bulunmaktadır (202).

Kalp kapak hastalıkları, hipertansiyon, KAH ve miyokardiyal infarktüs neticesinde kardiyomiyosit hipertrofisi ve kardiyak fibrozis gibi patofizyolojik süreçler oluşmaktadır. Bu süreçlerin hepsi mekanik yüklenmeye cevap olarak verilmekte ve duvar stresi bu şekilde normal sınırlara çekilmeye çalışılmaktadır. Bu cevaplar verilirken çoğu zaman ölümcül durumlar ortaya çıkmaktadır. IL33; kalpte mekanik yüklenme olduğunda kardiyak miyositler ve fibroblastlar arasında parakrin etki göstermektedir (7). Bu sitokin esas olarak kalpte fibroblastlar tarafından üretilse de aynı zamanda hücre nekrozu sırasında miyositler tarafından üretilmektedir (7, 203). TNF- α (tümör nekroz faktör α) ve interlökin-1 (IL-1) β tarafından gen ifadesi teşvik edilen IL33, pro hipertrofik etmenlere karşı hipertrofi oluşumunu engellemektedir (204). Farelerde yapılan çalışmalarda IL33'ün kardiyovasküler yüklenmenin olduğu

zamanlarda kalp hipertrofisi ve fibrozisi azalttığı bulunmuştur. Kalbi koruyucu bu bilgilere benzer şekilde hücre kültürü ortamındaki fibroblastlara uygulanan IL33 ile aynı sonuçlar alınmıştır (205).

Hücresel stres sırasında salınan IL33; ST2'ye bağlanarak etki göstermektedir. 1989 yılında keşfedilen ST2; IL1 reseptör protein ailesinin bir üyesi olup immün yanıt ve inflamatuvar cevabın düzenlenmesinde merkezi rol oynar (206). Hücrelerarası haberleşme kapasitelerinden dolayı sitokinler olarak da adlandırılan IL1 ailesiyle ilişkili olarak birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar vücut ısısının yükselmesi ile enfeksiyon veya inflamasyonun arasındaki bağın aydınlatmasına yardımcı olmuştur. IL1 ailesinin geniş fizyolojik rolü arasında hücrelerin stimülasyonu ve inhibisyonu vardır.

ST2 hakkında 1989 yılındaki keşif; büyüme ile uyarılan fibroblastlar üzerinde çalışan iki bağımsız laboratuvar tarafından tespit edilmiştir (207, 208). ST2; 15 yıl boyunca orphan reseptörü (immün ve inflamatuvar ilişkili reseptör) olarak bilinmiş (1989-2005), 2002 yılında kardiyak hücreler tarafından miyokardiyal strese yanıt olarak salındığı tespit edilmiş ve 2005 yılında IL33 reseptörü olarak tanımlanmıştır (209). Daha önceden birçok kaynaktan "growth stimulation expressed gene 2" olarak isimlendirilen ST2 geni, günümüzde en çok "İnterleukin 1 receptor like 1 (IL1RL1, GI:9173, NM: 001282408) olarak tanımlanmaktadır. Bu gen 2. Kromozom (2q12.1) üzerinde bulunmakta olup 7 exondan oluşmakta ve 211 aa uzunluğunda bir protein üretmektedir (206).

ST2 iki önemli izoforma sahip olup bu izoformlar membrana bağlı-ST2L (membrane bound form-mST2) ve çözünür halde (soluble) sST2'dir. Membran reseptör olan ST2L ayrıca IL1RL1-Beta olarak bilinmekte, soluble reseptör olan sST2 ise IL1RL1-Alfa olarak bilinmektedir (10). ST2'nin bilinen üçüncü izoformu ise variant form olan STV olup, bu izoform gastrointestinal sistemde baskın olarak ifade edilmektedir (210). ST2 geni proksimal ve distal promotorlara sahip olup ST2'nin izoformları aynı mRNA'nın alternatif "splicing" mekanizması ile oluşmaktadır (10).

Kalp hastalığı için potansiyel bir biyolojik belirteç olarak sST2'nin kullanılması ilk olarak 2002'de gerçekleşmiş olup, bu durum kültüre edilmiş rat kardiyomiyositlerinde sST2 mRNA'sının, mekanik zorlanma veya IL-1 β ile tedavi sonrasında indüklendiği tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada sST2 konsantrasyonları, miyokard enfarktüsünü takiben ratların kanında arttığı tespit edilmiştir (204).

Baba ve ark. tarafından yapılan çalışmada ST2 geninin transkripsiyonunun başladığı bölgenin “upstream” kısmında iki GATA motifi (1 ve 2) tespit edilmiştir. Aynı çalışmada özellikle GATA2'nin, ST2 mRNA ifadesinde kontrolü sağladığı ortaya çıkmış, sonuç olarak GATA motiflerinin ST2'nin ifadesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (211). sST2 ve ST2L'nin diferansiyel transkripsiyonunun iç kontrolü hakkındaki veriler zayıf olarak bilinmekte ve bu durum hematopoietik hücrelerle (GATA2, nörotropin p75 reseptörü) sınırlanmaktadır (211, 212). Genetik faktörler sST2 düzeylerinde bireylerarası değişkenliğin % 40'ına kadar etki etmektedir (213).

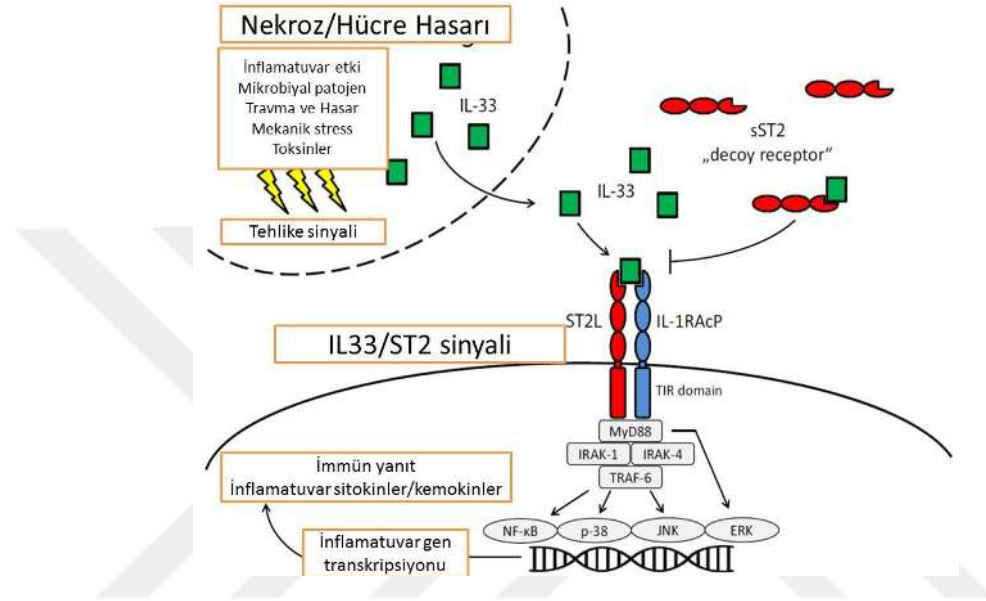
Membran bağımlı olan ST2L 3 domaine sahiptir. Bu domainlerden biri “zar dışı ekstraselüler immünoglobulin G domain”, diğeri “zar arası single trans membran domain”, bir diğeri ise “zar içi intraselüler” domainidir. Çözünür sST2'nin ise transmembran ve intraselüler domaini olmayıp 9 aa'lı C-terminal sekansa sahip olup perifer dolaşımda serbestçe hareket etmektedir (10, 214). ST2L ve sST2'nin ligandı IL33'tür (209). ST2 işlevi tam olarak anlaşılamamış olup IL33 etkisi ile ilişkilidir.

IL33 ST2L'ye bağlanarak inflamatuvar gen transkripsiyonuna neden olur ve sonuçta sitokinlerin/kemokinlerin üretimi tetiklenerek immün cevap oluşur. IL33; ST2L reseptörüne IL1RAcP aksesuar protein aracılığıyla bağlanır. IL1RAcP aksesuar proteini IL33'ün ST2L'ye bağlanma afinitesini artırmaktadır (215). ST2L'nin IL33'e bağlanması kardiyoprotektif sinyal kaskadını tetikleyip etki gösterirken (kardiyak hasarın düşmesi, apoptozun önlenmesi, inflamatuvar etkinin düşmesi, hipertrofi ve fibrozisin düşmesi, mekanik uyarı ve hasara karşı koruma), sST2'nin IL33'e bağlanması bu olumlu etkilerin ortadan kalkmasına neden olur (7, 216). sST2 bir tuzak reseptörü (decoy receptor) gibi davranarak, IL33'ün pozitif etkilerini azaltır (7). sST2 IL33'ü bağlayarak sarkolemmal (kas lifinin hücre zarı) reseptör ile etkileşim içine girerek IL33'ün kullanılabilişliğini azaltır. Bu nedenle sST2'de bir artış kardiyak hücreler üzerinde IL33'ün kardiyoprotektif etkisini azaltabilmekte ve genel kardiyovasküler risk profili üzerinde negatif bir prognostik etki yaratabilmektedir (7).

Çoklu klinik çalışmalara göre sST2 miyokard infarktüsü (217), akut dispne (218) ve kalp yetmezliği (15) gibi kardiyovasküler hastalıkları olan hastalar ile düşük riskli topluluk temelli bir popülasyonda (low-risk community-based population) klinik olarak yararlı bir prognostik biyolojik belirteç olarak ortaya çıkmıştır (219). Weinberg ve ark.

tarafından yapılan araştırmaya göre bir miyokard infarktüsü olayından hemen sonra artmış sST2 düzeyleri negatif bir prognostik faktör olarak ortaya çıkmıştır (204).

IL33/ST2L sinyali ile NF- κ B (nuclear factor kappa B), p38, JNK (jun N-terminal kinase) ve ERK (extracellular signal-regulated kinases) yoluyla çalışarak (Şekil 2.16) hücre içinde uyarı silsilesi meydana gelir (220). IL33/ST2L; ayrıca inflamatuvar hastalıklarda TH2 ilişkili sitokinleri salgılayarak immün cevaba katkı yapar (11).



Şekil 2.16. Interlökin-33/ST2L sinyali ile aktive olan hücre içi yolları (12).

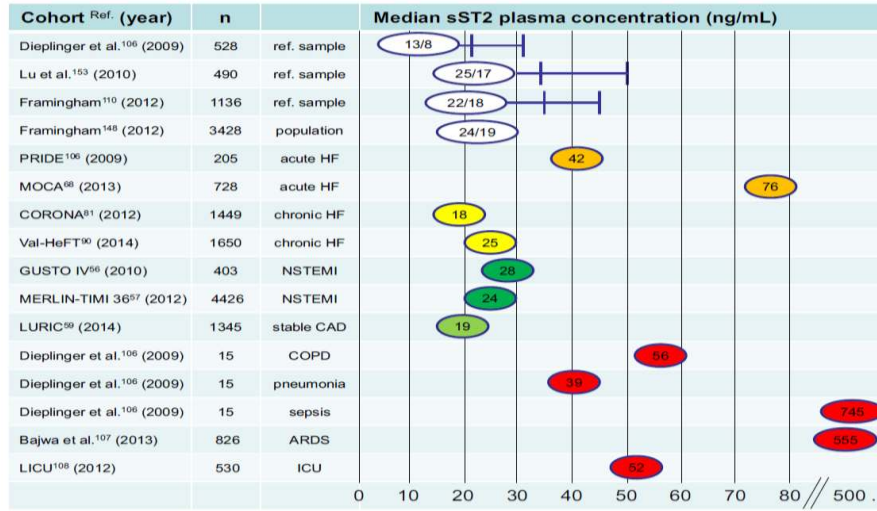
Kakkar ve ark. yaşayan hücrelerin mekanik gerilmesinde sitoplazmik veziküllerden IL33 salımını artırdığını göstermiştir (221). Yapılan başka bir çalışmada biyomekanik stres altında kardiyomiyositler ve kardiyak fibroblastlarda hem ST2L hem de sST2'nin paralel artmış salımını tespit edilmiştir (222). Ratlarla yapılan bir çalışmada biyokimyasal stres sonucunda binlerce gen transkriptinde en çok tetiklenen molekül ST2 olmuştur. Başka bir çalışmada ise ventriküllerin basınçla yüklenmesi modellerinde IL33 ile tedavi hipertrofiyi önlemiş, hipoksi durumunda ise IL33 kardiyomiyositleri apoptozdan kurtarmıştır. İskemi reperfüzyon MI'da IL33 tedavisi infarkt boyutunu azaltmış, ventriküler dilatasyon düzeltilmiş, kaspaz 3 baskılanmış ve apoptoz inhibitörleri artmıştır (11). IL33 bu tür olumlu etkileri ST2L aracılığıyla yapabilmektedir. ST2L'nin anti ST2L ile bloklanması sonucunda IL33'ün anti hipertrofik ve anti apoptotik etkisi ortadan kalkmıştır. Aynı durum sST2 eklenmesi ile IL33'ün olumlu etkisi kaldırılarak'ta görülmüştür. Bu çalışmalar ST2'nin önemini ortaya koymaktadır.

Sağlıklı bireylerde ve farklı hastalıkları olan hastalarda sST2 dolaşımının ana kaynağı şu anda tam olarak belirlenmemiştir. Bu, özellikle kalp hastalığı için geçerlidir. Neonatal sıçan kalp miyositlerinde yapılan bir çalışmada kalp hastalığında sST2 dolaşımının kaynağının miyokardiyal kökenli olduğu bulunmuştur (204). Bununla birlikte, daha yeni çalışmalar insan kalp hastalığında sST2'nin baskın kaynağı insan miyokardından çok vasküler endotel hücrelerinin kaynak olabileceğini göstermiştir. (223, 224). Eldeki çalışmaların hepsi beraber değerlendirildiğinde sST2'nin; hasar ve stres durumunda kardiyak fibroblast, kardiyomiyositler, makrovasküler (aorta ve koroner arterler) ve mikrovasküler endotel hücreleri tarafından üretildiği ortaya çıkmaktadır.

Kardiyovasküler sistem üzerindeki sST2 ve ST2L eylemleri hakkında artan bilgi hekimleri kalp yetmezliği ve iskemik kalp hastalıkları ile ilgili yeni bir marker olarak sST2 plazma düzeylerinin değerlendirilmesini düşünmeye itmiştir (225, 226). Bir hastalıkla ilgili klinik koşulların kötüleşen bulgularını erken tespit edebilen yeni biyolojik belirteçlerin tanımlanması, hastalığın olumsuz sonuçlarının durdurabilmesi veya azaltabilmesi klinik tanı gelişiminde temel bir adımdır. Dahası yeni belirteçler tedavilerin yararlarını erken teşhis etmek ve hastalığın prognozunu saptamak için kullanılabilir (214, 227).

sST2 konsantrasyonunun kantitatif ölçümü yapılarak seviyesi belirlenebilmektedir. İnsan serumunda/plazmada sST2 ölçümü için ilk enzime bağlı immünosorbent analiz 2000 yılında yapılmıştır (228). Yüksek seviyedeki sST2 kalbin yoğun bir şekilde stres altında olduğunu göstermektedir. Bu durum ise kalpte hücrel ölüm, doku fibrozisine, kalp fonksiyonlarının azalmasına ve hastalığın ilerleyişine neden olmaktadır. Bundan dolayı sST2 kardiyovasküler hastalıkta bireylerde kötüleşen prognozun bir biyobelirteci olarak kabul edilmektedir (10). Çözünür sST2 kalp yetmezli bireylerde ortaya çıkabilecek olumsuz sonuçların, hastanede yatış gerekliliğinin ve mortalitenin önemli bir göstergesi olan acil biyobelirteç olup kardiyovasküler hastalıklar için oldukça sağlam bir parametredir. Son zamanlarda dolaşımdaki sST2 için referans değerler Framingham çalışmasının (Framingham heart study) bir alt kümesinden türetilmiştir (Şekil 2.17). Bu çalışmaya göre erkek ve kadın bireyler arasında önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. Çalışmada erkek örnekleme ($n = 462$), sST2 için referans aralığı 11-45 ng / mL bulunurken, kadın örnekleme ($n = 674$) 9-35 ng / mL bulunmuştur (229).

Çalışma sonucunun cinsiyete özgü farklılıkların nedeni ve olası sonuçları açıklığa kavuşturulamamıştır (229, 230).



Şekil 2.17. sST2'nin serum/plazma konsantrasyon çalışmaları (231).

Yapılan birçok çalışmada sST2'nin normal ortalama değeri 18 ng/ml iken, 35 ng/ml'den yüksek konsantrasyonlar kardiyovasküler hastalıklar açısından yükselmiş riski güçlü bir biçimde belirtmektedir. Bu değer 35'in üzerine çıkması kardiyovasküler hastalıklara bağlı olumsuz durumları 3 kat artırdığı tespit edilmiştir (210). Çalışmalarda serum/plazma sST2 konsantrasyon farkının temel sebebi kullanılan kitlerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Örneğin günümüzde ELISA yöntemi ile sST2 çalışmaları genellikle 3 kit (Presage sT2 assay, R-D sT2 assay, MBL sT2 assay) aracılığıyla gerçekleştirilmektedir.

The Penn Heart Failure Study (PHFS) çalışması yüksek sST2 seviyelerinin, kalp yetmezli hastalarda ölüm, kalp transplantasyonu veya hastaneye yatışın kliniğe uygun bir biçimde öngörüselleştiğini ortaya çıkarmıştır (232). PHFS çalışmasına göre sST2 değeri 35 ng/ml'den yüksek olan hastaların 30 gün içerisinde olumsuz sonuçlara maruz kalması düşük sST2 konsantrasyonlu bireylere göre 2.8 kat daha yüksek risk taşıdığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmaya göre sST2 seviyesi 35 ng/ml'den yüksek olan kişilerde takip eden 4 yılda kalp hastalıkları açısından olumsuz sonuca maruz kalmadaki rölatif riskleri de 1.8 katta sebat etmektedir. Kalp hastalıklarının semptomlarının gözle görülebilir bir biçimde değişmesinden önce yüksek sST2 seviyesi hastalık durumunun kötüleştiğini yansıtabildiğinden plazmadaki sST2 seviyesi kronik kalp yetmezli hastalarda değerlendirilerek tedavi profili düzeltilebilir (15, 16).

ST2 hakkında yapılan yeni araştırmalara göre yüksek sST2 değerlerine sahip asemptomatik kişilerde HT, kalp yetmezliği ve kardiyovasküler mortalite riski artmakta ve böylece bu kişiler terapötik girişimlere aday hale gelmektedir. Framingham Heart Study Cohort'un yaptığı bir analize göre KAH yönünden asemptomatik bireylerin en az % 25'inde ST2 düzeyiönemli bilgiler vermektedir. Bu hastalardanen yüksek sST2 değerlerine sahip kişilerde ortalama 11.3 yıl sonra sST2 seviyeleri kalp yetmezliğiyle % 32, ölümle % 45 artmış riskli olarak ilişkilendirilmiştir. Yapılan başka çalışma sonuçlarına göre sST2 ayrıca güçlü bir iskemik belirteç olarak kendini göstermekte, özellikle kardiyomiyopati etiyolojilerini öngörebilmektedir. Bu bireylerde sST2 seviyesi kullanılarak yapılan uygun risk sınıflandırması hastalığa fayda sağlayacaktır. Bu sebeplerden dolayı tezimiz bu çalışmaları destekleyebilecek potansiyele sahiptir.

ST2; 2013 yılında ACCF/AHA (American College of Cardiology Foundation/American Heart Association) rehberinde HF (Heart failure) için "novel biyobelirteç" olarak tanımlanmıştır (233). İnsanlarda, akut miyokard infarktüsü veya akut koroner sendromlu hastalarda yapılan klinik çalışmalar, artmış sST2'nin kötü sonuçla ilişkili olduğunu açıkça ortaya koymuştur (234). AMI sonrası hastalarda sST2'nin erken ölçümü olumsuz sol ventrikülün fonksiyonel olarak toparlanma tahmininde yardımcı olabilmektedir (235). Akut göğüs ağrısı ile acil servise başvuran hastalarda sST2 ölçümü akut miyokard infarktüsü veya akut koroner sendrom teşhisi için değerli olmamasına rağmen (236, 237), son zamanlarda sST2'nin stabil koroner arter hastalığı olan hastalarda hastalığın uzun dönemli tüm nedenleri ve kardiyovasküler mortalitenin hakkında bağımsız bir öngörücü olduğu gösterilmiştir (238). Acil servislerde yapılan çalışmalarda sST2 tabanlı AMI tanısıyla ilgili bir rapor yayınlanmış olup, bu raporlarla ilişkili olarak sST2'yi genel mortalite için prognostik faktör olarak kabul edilmiş ve konu ile ilişkili bir patent başvurusu yapılmıştır (236).

sST2 son dönemde HF tanısı için değerlendirmede; natriüretik peptidler ve kardiyak troponinlerden bağımsız bir biyobelirteç olup STEMİ, NSTEMİ, koroner arter hastalığı, valvüler hastalıklar, kardiyomiyopati, koroner bypass ve kalp cerrahisi, akut kardiyak allograft rejection ve akut kawasaki hastalıklarında önemli bir işarettir (13, 14,210).

Teşhis ve prognozda kullanılan optimum biyolojik bir belirtecın öncelikle diğer faktörlerden bağımsız olması gerekir. Örneğin kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan bir belirtecın başka koşullarla ilişkisinin olmaması ve kan konsantrasyonlarını etkileyebilecek karıştırıcı faktörlerden etkilenmemesi gerekir. Bir hastalıkta kullanılan

bir biyobelirtecın güvenilir bir biyolojik belirteç haline gelebilmesi için bir "optimal koşul" olmalıdır. Bu özelliklere sahip olan ST2 yaş, beden kitle indeksi ve böbrek fonksiyon bozukluğu gibi faktörlerden etkilenmemektedir (11, 13, 14, 16). sST2'nin in vitro stabilitesi üzerine yapılan çalışmaların sonuçlarına göre sST2 analiti oda sıcaklığında 48 saat, 4  C'de en az 7 gün, -20  C'de ve -80  C'de en az 1.5 yıl kararlı kalmaktadır (239, 240, 241).

şu ana kadar yapılan çalışmalara rağmen sST2 seviyesinin miRNA'ların hedefi olarak değişip değişmediğiyle ilgili araştırmalar eksik olup örneğin; hipertrofi ve fibrozis oluşumunda miRNA'ların IL33/ST2 sinyal yolağındaki etkisi hakkında araştırma bilgi yetersizliğinden dolayı belirsiz kalmıştır (202). Yaptığımız araştırmalar ST2 ile ilişkili miRNA'ların KAH'taki durumda etkin olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Yapılan Hastalar

Bu çalışmaya Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kalp Damar Cerrahisi ameliyathanesinde kardiyopulmoner bypass (KPB) yöntemi ile koroner arter bypass ameliyatı olan 40 gönüllü hasta dâhil edildi. Çalışma yapılmadan önce Harran Üniversitesi Etik Kurulundan 05.01.2017 tarihli 17/01/23 sayılı karar ile onay alındı. Gönüllülerden PS ve plazma örnekleri elde edildi. Numune alınan 40 hastadan uygun görülmeyen 13 hemolizli örnek çalışmadan çıkarılarak geri kalan 27 hasta numunesi çalışma kapsamına alındı. Çalışmaya başlanmadan önce toplanan PS ve kan plazmasının sağlıklı toplanıp toplanmadığını test etmek amacıyla deneme çalışması yapıldı. Bunun için 3 hastaya ait PS ile kan plazmasında sST2 ve sST2'yi hedefleyen miRNA'ların ölçümü yapıldı. Çıkan sonuçlara göre değerlendirmeler yapılarak, herhangi bir olumsuz duruma karşı alternatif çözüm yolları belirlendi. Her hastadan alınan PS için santrifüj edilmiş ve edilmemiş olarak 2 farklı numune ayrıldı. Her bir hastaya ait olan yedek numune saklandı ve ihtiyaç duyulduğunda bu numuneler kullanıldı.

3.2. Perikardiyal Sıvının Eldesi

Çalışmamızda rutin olarak cerrahisi planlanmış hastanın sağlık problemine yönelik yapılan cerrahi işlem sırasında rutin olarak alınan PS kullanıldı. KPB yöntemi ile koroner bypass cerrahisine alınan hastalarda standard kardiyopulmoner bypass prosedürleri ile median sternotomi yapıldıktan sonra perikardiyum açıldı ve steril enjektör ile PS aspire edildi. Normalde perikardiyum kesildikten sonra perikardiyal boşlukta bulunan sıvı aspire edilmekte ve bu sıvı atık kabına atılmaktadır. Çalışmamız için hastaya ekstra bir girişimde bulunulmamış olup, atıl duruma gelen PS kullanılmıştır. Aspire edilen PS (2-25 ml) daha sonra antikoagülansız steril tüplere alınarak, steril tüp hemen buz dolu kabın içine aktarıldı. Daha sonra steril tüp içerisindeki PS +4°C'de 5000 rpm'de 5 dk santrifüj aşamasından geçirilerek hücrelerden arındırıldı. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant kısım alınarak hücre debrisleri ve diğer mikropartiküllerinden ayırtmak için iki sefer 4°C'de 10000 rpm'de 10 dk santrifüj aşamasından geçirildi. Daha sonra süpernatant kısım RNase-free tüpe (ependorf tüp) alınarak çalışılmak üzere -80 °C'de saklandı. Çalışma için yeterli hastadan numune toplandıktan sonra ELİSA (enzyme-linked immunosorbent assays) ve

qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR-gerçek zamanlı PCR) çalışmaları gerçekleştirildi.

3.3. Kan Plazmasının Eldesi

KPB yöntemi ile koroner bypass cerrahisine alınan hastalarda kardiyopulmoner bypass öncesinde kan alınarak antikoagülanlı (heparinli) steril tüplere konuldu. Kan alınan tüp hemen buz dolu kabın içine aktararak laboratuvara ulaştırıldı. Daha sonra steril tüp 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant kısım olan plazma RNase-free tüpe (ependorf tüp) alınarak çalışılmak üzere -80 de saklandı. Çalışma için yeterli hastadan kan plazması toplandıktan sonra ELİSA ve qRT-PCR çalışmaları gerçekleştirildi.

3.4. PS ve Plazmada ST2 Gen İfadesi Çalışma Aşamaları

3.4.1. ST2 gen ifade düzeyi için PS ve plazmada total RNA (mRNA) izolasyonu

PS ve Plazmada mRNA izolasyonu için üretici firmanın çalışma prosedürü takip edilmiş olup aşağıdaki sıraya göre işlemler gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada ticari adı Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) miRNeasy Serum/Plasma Kit (Cat No./ID: 217184) olan izolasyon kiti kullanılmıştır. Kit seti içerisinde 50 RNeasy MinElute Spin Columns, Collection Tubes (1.5 ml -2 ml), QIAzol Lysis Reagent, RNase-free Reagents ve Buffers bulunmaktadır. Kitin iş akış şemasına göre prosedür aşağıdaki gibidir.

1. -80'den alınan PS ve plazma örneklerinin erimesi beklendi ve numaralandırma yapıldı.
2. Örneğimizin 5 katı kadar QIAzol Lysis Reagent eklendi (200 µl örnek için 1ml QIAzol Lysis Reagent eklenir). Elde edilen karışım vortekslendi.
3. Karışım oda sıcaklığında (15°C- 25°C) 5 dakika homojenize olması için inkübe edildi.
4. 3.5µl miRNeasy Serum/Plasma spike kontrol (1.6x10⁸'e dilüe edilerek kullanılır) eklendi.
5. Örneğin başlangıç hacmi kadar kloroform eklenip (örn. 200 µl örnek için 200 µl kloroform eklenir). 15 sn. iyice vortekslendi.
6. Oda sıcaklığında 2-3 dk. inkübe edilip, 15 dk. 12,000 x g'de 4°C'de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası oluşan üç fazdan en üstteki faz pipetle alınarak yeni bir tüpe aktarıldı.

8. Alınan üst fazın 1.5 katı kadar % 100 etanol (600 µl üst faz için 900 µl %100 etanol eklenir) eklenip iyice pipetaj yapıldı.
9. 700 µl örnek 2 ml'lik spin kolona aktarılarak, kapağı kapalı bir şekilde 8000 x g'de 15 sn. ve oda sıcaklığında santrifüj edildi. Toplama tüpteki sıvı dökülerek bu işlem örnek bitene kadar tekrarlandı.
10. Örneğin tamamını spin kolondan geçirdikten sonra alt kısım yine döküldü. 700 µl RWT buffer spin kolona eklenerek, kapağı kapalı bir şekilde 8000 x g'de 15 sn. ve oda sıcaklığında santrifüj edildi.
11. 500 µl RPE buffer spin kolona eklenerek, kapağı kapalı bir şekilde 8000 x g'de 15 sn. ve oda sıcaklığında santrifüj edildi.
12. 500 µl % 80 etanol spin kolona eklenerek, kapağı kapalı bir şekilde 8000 x g'de 2 dk. ve oda sıcaklığında santrifüj edildi.
13. Yıkama işlemi bittikten sonra 2 ml'lik toplama tüpü değiştirilerek ağzı açık bir şekilde en yüksek hızda santrifüj edildi.
14. 2ml'lik toplama tüpü atılarak filtre 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alındı ve filtre üzerine 14 µl RNase-free su eklendi. Kapağı kapalı bir şekilde en yüksek hızda ve oda sıcaklığında 1 dk. santrifüj edildi.
15. Filtre atılıp, eppendorf tüplerin kapakları kapatılarak çalışma zamanına kadar - 80 °C'de muhafaza edildi.

3.4.2. ST2 gen ifade düzeyi için PS ve plazmada mRNA'dan cDNA eldesi

Elde edilen total RNA içindeki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için RT² First strand kit (RT² HT First Strand Kit, Qiagen, GmbH, Hilden, Almanya, Cat No./ID: 330411) kullanıldı. mRNA'dan cDNA elde etmek için uygulanan Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımının içerikleri Tablo 3.1'de belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 3.1. mRNA'dan cDNA eldesi için Revers Transkriptaz PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktar
RNA	500 ng/µl
Buffer GE (genomik DNA'nın uzaklaştırılması)	2 µl
RNase-free water	Total 10µl olacak şekilde ayarlandı.

Kitin iş akış şemasına göre ilgili prosedür takip edildi.

1. Ön karışım dikkatlice karıştırılarak 42 °C’de 5 dk inkübe edildi. Ardından 1 dk soğuk blok üzerinde tutularak Tablo 3.2’de belirtilen karışım hazırlanarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. mRNA’dan cDNA eldesi için reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktar
Revers Transkriptaz	6 µl
RNase-free water	4 µl

2. Bir önceki basamakta elde edilen karışım üzerine ikinci basamak için hazırlanan karışım (her bir örnek için 10 µl) eklenerek homojen hale getirildi.
3. 42°C’de 15 dk ve 95°C’de 5 dk olacak şekilde RT-PCR yapılarak total cDNA elde edildi. Sonra elde edilen cDNA -20 °C’de saklandı.

3.4.3. ST2 gen ifade düzeyi için PS ve plazmada elde edilen cDNA’lardan kalite ve miktar tayini

İfade analizi deneyleri öncesi elde edilen cDNA örneklerinin miktarlarını ve kalitesini belirlenmek, tüm örnekleri aynı yoğunlukta reaksiyona tabi tutmak amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Kalite ve miktar tayini Thermo Scientific Multiskan Spectrophotometer System (Waltham, Massachusetts, ABD) cihazı kullanılarak yapıldı. İfade analizi deneyleri öncesi örneklerden elde edilen cDNA miktarları mRNA cDNA’sı için 50 ng/µl’e ayarlandı.

3.4.4. ST2 gen ifade düzeyi için PS ve plazmada mRNA- cDNA preamplifikasyonu (preAmp)

Primer pool: 40 µl (20 µl F (10 pmol/µl) + 20 µl R (10 pmol/µl)) primer kullanıldı. Her primer başına 210 µl su eklenmiş olup ilgili içerik Tablo 3.3’te verilmiştir.

Tablo 3.3. ST2 ifade düzeyi için primer pool karışımı

1 örnek için	
5x miscript master mix	12,5 µl
Taq polimeraz	0,5 µl (250 unit)
Primer pool	7,5 pmol/µl
Total mix: 20,5µl	

Total mix'e 5µl cDNA eklenerek reaksiyon 25,5 µl'de gerçekleştirildi.

3.4.5. PS ve plazmada ST2 gen ifade düzeyi için PCR protokolü

ST2 ifade düzeyi için PS ve Plazmada PCR protokolü için Tablo 3.4'e göre rutin PCR prosedürü uygulandı.

Tablo 3.4. ST2 ifade düzeyi için rutin PCR protokolü

Sıcaklık (°C)	Zaman	
95	10 dk	
94	15 sn	} 12 döngü
60	2 dk	
+4		

PCR sonrasında elde edilen ürün 91 µl su ile dilüe edilerek, Real time PCR için 5 µl kullanıldı.

3.4.6. PS ve plazmada ST2 gen ifade düzeyi için real-time PCR (qRT-PCR) yöntemi

Eş zamanlı PCR reaksiyonu için Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazı ve QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya, Cat No./ID: 204143) kullanıldı. Eş zamanlı PCR reaksiyonu DNA bağlayan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı olarak takibi sağlanır. Çift iplikli DNA molekülüne bağlanarak floresan ışığa veren SYBR Green bu amaçla sıklıkla kullanılan boyalardan biridir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış olmaktadır. SYBR Green boyasından alınan ışımanın sınır değeri aştığı noktaya Ct (cycle threshold) veya Cp (Crossing points) değeri adı verilmektedir. Ct veya Cp noktasında DNA amplifiye olmuş ve DNA'ya bağlanan boyanın verdiği ışığa sınır değeri aşmıştır. Işımanın sınır değeri aştığı anda amplifikasyondan emin olunur ancak doğru amplikonun takibinin yapıldığının belirlenebilmesi için erime eğrisinin incelenmesi gerekmektedir.

qPCR karışımı: qRT-PCR için Tablo 3.5'e göre bileşen ve hacim kullanıldı.

Tablo 3.5. ST2 ifade düzeyi için qRT-PCR bileşenleri

Bileşenler	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermix	5 µl
F Primer (10 pmol/µl)	0.3 µl
R Primer (10 pmol/µl)	0.3 µl
RNaz/DNaz içermeyen su	3.9 µl
cDNA (50 ng/µl)	0,5 µl
Total	10 µl

Hazırlanan karışım 9.5 µl olacak şekilde uygun tüplere dağıtılarak, her örneğe ait 0.5 µl cDNA, eş zamanlı PCR ön karışımı içeren her tüpe eklendi ve aşağıdaki Tablo.3.6’da belirtilen PCR koşullarında çalışma gerçekleştirildi.

Tablo 3.6. ST2 için eş zamanlı PCR ayarları

	Sıcaklık (°C)	Süre	
Enzim aktivasyonu	95	10 dk	
Denatürasyon	95	15 sn	} 40 döngü
Primer bağlanması/uzama	60	60 sn	

3.4.7. PS ve plazmada ST2 ifade düzeyi için primer seçimi

Çalışmada ST2 primerleri (metabion international AG / metabion GmbH, Germany) ile housekeeping bir gen olan Beta Actin kullanılmıştır. ST2 primerleri, NCBI veri tabanında yer alan “Gene” arayüzü (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) kullanılarak tasarlandı. Kullanılan ST2 ve Beta Actin primerlerinin Forward ve Reverse primer dizilimleri Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. ST2 ve Beta Actin forward ile reverse primerleri

	Forward primer	Reverse primer
ST2	5’-TTCCAGTAATCGGAGCCCCT-3’	5’-AACCATGTGCAAGGGGAAGAG-3’
BETA ACTİN	5’-CGTACCACAGGCATTGTGATG-3’	5’-TTTGATGTACGCACGATTTC-3’

3.5. PS ve Plazmada miRNA İfadesi Çalışma Aşamaları

3.5.1. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için mikroRNA izolasyonu

PS ve Plazmada mikroRNA izolasyonu için üretici firmanın çalışma prosedürü takip edilmiş olup, aşağıdaki sıraya göre işlemler gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada ticari adı Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) miRNeasy Serum/Plasma Kit (Cat No./ID: 217184) olan izolasyon kiti kullanılmıştır. Kit seti içerisinde 50 RNeasy MinElute Spin Columns, Collection Tubes (1.5 ml -2 ml), QIAzol Lysis Reagent, RNase-free Reagents ve Buffers bulunmaktadır. Kitin iş akış şemasına göre prosedür aşağıdaki gibidir.

1. -80'den alınan PS ve plazma örneklerinin erimesi beklendi. Bu sırada numunelere numaralandırma yapıldı.
2. Numunelerin üzerine numune miktarının 5 katı kadar QIAzol Lysis Reagent eklendi (200 µl örnek için 1ml QIAzol Lysis Reagent eklenir). Elde edilen karışım vortekslendi.
3. Karışım oda sıcaklığında (15°C- 25°C) 5 dakika homojenize olması için inkübe edildi.
4. Üzerine 3.5 µl miRNeasy Serum/Plazma spike kontrol eklendi (1.6×10^8 'e dilüe edilerek kullanılır).
5. Örneğin başlangıç hacmi kadar üzerine kloroform eklenip (örn. 200 µl örnek için 200 µl kloroform eklenir) 15 sn. iyice vortekslendi.
6. Oda sıcaklığında 2-3 dk. inkübe edilip, 15 dk. 12,000 x g 4°C 'de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası oluşan üç fazdan en üstteki faz pipetle alınarak yeni bir tüpe aktarıldı.
8. Alınan üst fazın 1.5 katı kadar % 100 etanol eklenip (600 µl üst faz için 900 µl %100 etanol eklenir) iyice pipetaj yapıldı.
9. 700 µl örnek 2 ml.'lik spin kolona aktarılarak, kapağı kapalı bir şekilde oda sıcaklığında 8000 x g'de 15 sn. santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı dökülerek bu işlem örnek bitene kadar tekrarlandı.
10. Örneğin tamamını spin kolondan geçirdikten sonra alt kısım yine döküldü. Üzerine 700 µl RWT buffer spin kolona eklenerek, kapağı kapalı bir şekilde oda sıcaklığında 8000 x g'de 15 sn. santrifüj edildi.
11. 500 µl RPE buffer spin kolona eklenerek, kapağı kapalı bir şekilde oda sıcaklığında 8000 x g'de 15 sn santrifüj edildi.

12. 500 µl % 80 etanol spin kolona eklenerek, kapağı kapalı bir şekilde oda sıcaklığında 8000 x g'de 2 dk. santrifüj edildi.
13. Yıkama işlemi bittikten sonra 2ml.'lik toplama tüpü değiştirilerek ağzı açık bir şekilde en yüksek hızda santrifüj edildi.
14. 2 ml'lik toplama tüpü atılarak filtre 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alındı ve filtre üzerine 14 µl RNase-free su eklendi. Kapağı kapalı bir şekilde en yüksek hızda ve oda sıcaklığında 1 dk. Santrifüj edildi.
15. En son aşamada filtre atılıp, eppendorf tüplerin kapakları kapatıldı ve elde edilen çalışma materyali -80 °C'de muhafaza edildi.

3.5.2. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için miRNA'dan cDNA eldesi

miRNA'dan cDNA eldesi için ticari olarak temin edilen Qiagen miScript Reverse Transcription (RT) Kit II (Hilden, Almanya, Cat No./ID: 218161) kullanılmıştır. Kullanılan kit içerisinde miScript Reverse Transcriptase Mix, 10x miScript Nucleics Mix, 5x miScript HiSpec Buffer, 5x miScript HiFlex Buffer ve RNase-Free Water bulunmaktadır. Çalışma aşamaları kitin içinde yazılı olan prosedürlere göre gerçekleştirilmiştir. Bunun için aşağıdaki çalışma sırası takip edilmiştir.

1. cDNA için bileşenler ve miktarları Tablo 3.8'e göre RT toplam karışım buz üzerinde hazırlanıp, RNA'nın miktarı 20 µl hacim içerisinde 200 ng/µl olacak şekilde ayarlandı.
2. İzole edilen RNA, RT karışımı içeren her bir tüpe eklendi ve kısa süreliğini buz üzerinde bekletildi.
3. 37 °C'de 60 dk, 95 °C'de 5 dk olan tepkime koşullarına göre RT-PCR yapıldı.
4. Sonrasında cDNA miktarları 50 ng/µl olacak şekilde ayarlanıp, qRT-PCR için kullanıma hazır hale getirildi.
5. cDNA'ların kullanım ömrünü uzatmak için -80 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.8. miRNA'dan cDNA eldesi için bileşenler ve miktarları tablosu

Bileşenler	Tepkime Hacmi
5x miScript HiSpec tamponu	2 µl
10x miScript Nükleik asit karışımı	1 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	1 µl
RNaz içermeyen su	Değişken (ör: 6-x eklenir)*
Kalıp RNA	Değişken (ör: x hacmi bulunur-500 ng/µl)
Toplam Hacim	10 µl

*RNA miktarına göre (x) su miktarı ayarlanır (6-x).

3.5.3. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için elde edilen cDNA'lardan kalite ve miktar tayini

İfade analizi deneyleri öncesi elde edilen cDNA örneklerinin miktarlarını, kalitesini belirlemek ve tüm örnekleri aynı yoğunlukta reaksiyona tabi tutmak amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Kalite ve miktar tayini Thermo Scientific Multiskan Spectrophotometer System (Waltham, Massachusetts, ABD) cihazı kullanılarak yapıldı. İfade analizi deneyleri öncesi örneklerden elde edilen cDNA miktarları mikroRNA cDNA'sı için 50 ng/µl'e ayarlandı.

3.5.4. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için miRNA'dan cDNA –preAmp (preamplifikasyon) aşaması

Primer pool: Çalışmamızda kullanılacak primerler başına 10 µl olacak şekilde Tablo 3.9'a göre son hacim 250 µl (6 miRNA için 60 µl primer üzerine 190 µl DNaz/RNaz free su) olarak ayarlandı. Üzerine 5 µl cDNA eklendi.

Tablo 3.9. miRNA'dan cDNA –preAmp aşaması primer pool içerikleri

1 örnek için	
5x miscript master mix	5 µl
Taq polimeraz	2 µl (250 unit)
Primer pool	5 pmol/µl
Su	7 µl
Universal primer	1 µl
Total mix: 20 µl	
cDNA : 5 µl	

3.5.5. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için PCR protokolü

PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için Tablo 3.10'a göre rutin PCR protokolü uygulandı.

Tablo 3.10. miRNA'dan cDNA eldesi için rutin PCR protokolü

Sıcaklık (°C)	Zaman
95	15 dk.
94	30 sn. } 12 döngü
60	3 dk. }
+4	

3.5.6. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için qRT-PCR (real time-PCR, eş zamanlı-PCR)

qRT-PCR için tepkime bileşenleri Qiagen miScript SYBR Green PCR (Cat No./ID: 218073) kiti kullanılarak hazırlandı. Eş zamanlı PCR reaksiyonu için Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazı kullanıldı. Çalışma için kullanılacak hacimler aşağıda Tablo 3.11'deki bileşenlerin tepkime hacimlerine göre kullanıldı.

Tablo 3.11. miRNA ifade düzeyleri için qRT-PCR bileşenlerin oranları

Bileşenler	Hacim
2x QuantiTect SYBR Green PCR Toplam Karışım	6.25 µl
10x miScript Universal Primer	1.25 µl
10x miScript Primer Assay (ilgili miRNA primer)	1.25 µl
RNaz içermeyen su	3.125 µl
Kalıp cDNA (5 ng/µl)	0.63 µl
Toplam hacim	12.5 µl

Buz üzerinde tepkime bileşenleri hazırlandı ve uygun tüplere cDNA'lar ile dağıtılıp, qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Almanya) cihazına yüklendi. Tablo 3.12'de yazılan qRT-PCR tepkime koşullarına göre tespit işlemleri gerçekleştirildi.

Tablo 3.12. miRNA ifade düzeyleri için qRT-PCR tepkime koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman	
95	15 dk	
94	15 sn	} 40 döngü
55	30 sn	
70	30 sn	

3.5.7. PS ve plazmada miRNA ifade düzeyi için miRNA primer seçimi

Çalışmada 6 adet hsa miScript Primer Assay'ler (miR-125b-5p, miR-320b, miR-34a-5p, miR-16-5p, miR-320a ve miR-15a-5p) kullanılmıştır. hsa miScript Primer Assay'ler ticari olarak Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya, ürün kodu: 218300) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan hsa miScript Primer Assaylerin 5' ucu ve ticari katalog numaraları Tablo 3.13'te gösterilmiştir.

Tablo 3.13. hsa miScript Primer Assaylerin 5' ucu ve ticari katalog numaraları

Primer assay	5'ucu	Cat. No.
miR-125b-5p	5'UCCCUGAGACCCUAAACUUGUGA	MS00006629
miR-320b	5'AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA	MS00031703
miR-34a-5p	5'UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	MS00003318
miR-16-5p	5'UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	MS00031493
miR-320a	5'AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	MS00014707
miR-15a-5p	5'UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	MS00003178

3.6. PS ve Plazmada ST2 İçin ELİSA Çalışması

ST2 ELİSA çalışması için ‘‘Human sST2 (soluble ST2) ELISA Kit (Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Product ID: E-EL-H1615)’’ ticari kiti kullanılmıştır. Kullanılan bu kitin tarama aralığı (Assay Range) 31.25 ~ 2000 pg/mL olup, duyarlılığı (Sensitivity) 18.75 pg/mL'dir.

Ticari olarak elde ettiğimiz ELİSA kitinde yöntem olarak Sandwich-ELISA metodu kullanılmaktadır. Bu kitte bulunan mikro ELISA plakası, sST2'ye özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, uygun mikro ELISA plaka

kuyularına eklenince spesifik antikor ile bağlanır. Ardından sST2 ve Avidin-Yorasınav Peroksidaz (HRP) konjüгатına spesifik bir biyotinlenmiş tespit antikorunu, her mikro plakaya ardı ardına eklenir ve sonrasında inkübasyona bırakılır. Ardından serbest bileşenler yıkanır. Sonrasında substrat çözeltisi her oyuğa eklenir. Sadece sST2, biyotinlenmiş tespit antikorunu ve Avidin-HRP konjüгатı içeren kuyular renkte mavi renkte bürünür. Enzim-substrat reaksiyonu bir sülfürik asit çözeltisi eklenerek sonlandırılır ve renk sarı renge döner. Sonrasında optik yoğunluk (OD) 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri sST2 konsantrasyonu ile orantılı olup örneklerdeki OD'yi standart eğriye kıyaslayarak numunelerdeki sST2 konsantrasyonu hesaplanır. Kit içeriğinde; Micro ELISA Plate, Reference Standard, Reference Standard & Sample Diluent, Concentrated Biotinylated Detection Ab, Biotinylated Detection Ab Diluent, Concentrated HRP Conjugate, HRP Conjugate Diluent, Concentrated Wash Buffer (25 $\times$), Substrate Reagent, Stop Solution ve Plate Sealergibi malzemeler bulunmaktadır. Çalışılacak olan perikard ve plazma örnekleri -80 °C'den çıkarılarak en az 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra kit protokolüne göre iş şeması uygulandı.

3.6.1. PS ve plazmada ST2 için ELİSA çalışmasında standart hazırlama: Liyofilize halde olan standart (2000 pg/mL stok) 10,000 g'de 1 dk. santrifüj edildi ve üzerine 1ml Reference Standard & Sample Diluent eklenerek homojenizasyonu sağlandı ve yaklaşık 10 dk. bekletildi.

3.6.2. PS ve plazmada ST2 için ELİSA çalışmasında seri dilüsyon yöntemi ile standartlar hazırlama: 8 adet steril tüp yazılarak (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.3, 31.25, 0 pg/mL) 500 μ l Reference Standard & Sample Diluent eklendi. Stok solüsyonundan 500 μ l alınarak ilk tüpe aktarıldı ve pipetaj yapılarak bir sonrakine aktarıldı. Bu şekilde (son tüp hariç-blank) son tüpe kadar devam edildi.

3.6.3. PS ve plazmada ST2 için ELİSA çalışmasında biyotinlenmiş deteksiyon çalışma solüsyonu hazırlama: Konsantre Biotin solüsyonu 1:100 oranında biyotinlenmiş seyreltici ile hazırlandı.

3.6.4. PS ve plazmada ST2 için ELİSA çalışmasında konsantreHRP konjugat çalışma solüsyonu hazırlama: Konsantre HRP Konjugat 1:100 oranında HRP konjugat seyreltici ile hazırlandı.

3.6.5. PS ve plazmada ST2 için ELİSA çalışmasında kitin çalışma prosedürü

1. 96 kuyucuklu playte 100 µl standart ve örnek olacak şekilde dikkatlice eklendi. Yapışkan film ile kaplandı ve 90 dk 37°C’de inkübe edildi. Kuyucuklardaki sıvı döküldü.
2. Hemen sonrasında hazırlanan Biyotinlenmiş deteksiyon çalışma solüsyonundan 100 µl eklenerek 1 saat 37°C’de inkübe edildi.
3. Tüm kuyucuktaki sıvılar uzaklaştırıldı ve yaklaşık 350 µl olacak şekilde yıkama solüsyonu (30 ml konsantre wash+750 ml d H₂O) ile 1-2 dk arayla 3 tekrar yıkandı.
4. 100 µl HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklendi ve 30 dk. 37°C’de inkübe edildi.
5. Tüm kuyucuktaki sıvılar uzaklaştırıldı ve yaklaşık 350 µl olacak şekilde yıkama solüsyonu (30 ml konsantre wash + 750 ml d H₂O) ile 1-2 dk arayla 5 sefer tekrar yıkandı.
6. 90 µl substrat eklenerek 15 dk 37°C’de karanlık ortamda inkübe edildi.
7. 50 µl stop solüsyonu eklenerek enzim aktivitesi durduruldu.
8. Numunelerin optik yoğunluğu (OD) 450 nm’de okutularak tespit edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda PS ve Plazmada sST2 Eliza sonuçlarının istatistiğinde ‘Prism 6’ (GraphPad Software, Inc, San Diego, USA) programı, ST2 ve 6 adet miRNA ifade düzeylerinin verilerinin istatistiki değerlendirilmesinde Qiagen web sayfası (The GeneGlobe Data Analysis Center), PS ve Plazmadaki ST2-miRNA korelasyonu için ise SPSS 17 (SPSS Statistics 17.0- <https://www.ibm.com/analytics/data-science/predictive-analytics/spss-statistical-software>) programı kullanılmıştır.

Çalışmamızda PS ve Plazmada sST2 Eliza sonuçlarının istatistiğinde Mann-Whitney U testi, PS ve Plazmada ST2 ve miRNA gen ifade sonuçlarının istatistiğinde ise Student t-test’i, PS ve Plazmada ST2 ile miRNA arasındaki korelasyon için ise SPSS ‘pearson korelasyon’ analizi kullanılmıştır. Her test grubu uygun kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak p<0.05’ten küçük değerler anlamlı kabul edildi.

İstatistiksel analizler için çalışmalar tamamlandıktan sonra; öncelikle veriler değerlendirildi. Daha sonra verilerin normal dağılımlı olup olmadıklarına bakıldı, duruma göre tek yönlü varyans analizi yapıldı. Grupların karşılaştırmalarında; verilerin

normal dağılıma sahip olup olmadığını tespit etmek için Shapiro-Wilk tanıtıcı testi kullanıldı. Shapiro-Wilk testi sonucunda gruplarda normal dağılım çıktığında anlamlı fark testi için Student t- test, normal dağılım çıkmadığında ise anlamlı fark testi için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

qRT-PCR yönteminde elde edilen Ct (cycle threshold-döngü eşiği) ya da Cp (Crossing points) değerleri PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artışı ifade etmektedir. Her bir örneğe ait her bir genin Ct değerleri; housekeeping gen Ct değerinden çıkartılarak delta siklus eşiği (ΔCt) değerleri hesaplanmaktadır. ΔCt değeri ilgili genin referans gene göre hangi oranda ifade düzeyinin değiştiğini göstermektedir. ΔCt değeri göreceli ifade bilgisi vermektedir. $\Delta Ct = \text{Gen Ct} - \text{Referans Ct}$. qRT-PCR sonuçlarında ilgili genin referans gene göre kıyaslaması için $2^{-\Delta Ct}$ formülü ($2^{-\Delta Ct} = 2^{-(\text{Gen Ct} - \text{Referans Ct})}$) kullanılmaktadır. Her bir hastanın ΔCt değerleri kontrol grubunun Ct değerinden çıkartılarak delta delta siklus eşiği ($\Delta\Delta Ct$) değerleri hesaplanmaktadır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change) formülü ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\text{Örnek } \Delta Ct - \text{Gen Referans } \Delta Ct)}$) ise ilgili genin son değer başlangıca olan oranı alınarak belirlenmektedir. Bu değer bize ilgili genin ifade düzeyinin, kontrol gen baz alınarak birbirine göre kıyaslanmasını sağlar; yani, katsayı bilgisi verir.

3.8. Qiagen İstatistiksel Analiz

Çalışmalardan elde edilen verilen değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi için Qiagen web sayfasındaki (<https://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>) program kullanılmıştır. İlgili web sayfasındaki “The GeneGlobe Data Analysis Center” kısmı qRT PCR veya NGS verilerini analiz eden araştırmacılar için bir web kaynağıdır. İlgili web sayfasındaki qRT PCR modülleri; Threshold cycle-Ct değerlerini, gen ve miRNA ifadesi için hesaplanan sonuçlara dönüştürmektedir. İlgili web sayfasında değerler sisteme girilirken preamplifikasyon seçeneği işaretlenerek analiz yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubu Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 27 hastaya ait demografik özellikler Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmaya alınan hastalara ait demografik özellikler

Değişken	Hastalar (n = 27)
Cinsiyet (Kadın/Erkek) %	9/18 (% 33.3 / % 66.7)
Yaş (yıl)	61 ± 9,78
Boy (cm)	166,96 ± 8,19
Kilo (kg)	77,70 ± 20,10
BSA (Vücut yüzey alanı) (m ²)	1,83 ± 0,15

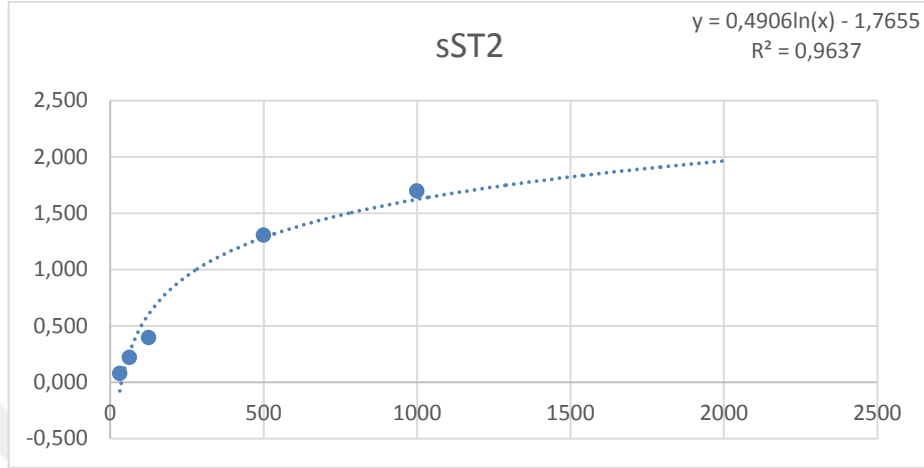
Çalışma sonunda PS ve plazmada elde edilen sST2 ve miRNA'lara ait ELİSA ve gen ekspresyon sonuçları ise Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. PS ve plazmada sST2 ve miRNA'lara ait ELİSA ve gen ekspresyon sonuçları

Parametreler ve Birim	Ort. ve St. Sapma
PS_sST2_ELİSA_ng_ml	223,99 ± 196,28
Plas_sST2_ELİSA_ng_ml	390,35 ± 252,45
PS_ST2_QRT_Ct	13,33 ± 0,59
Plas_ST2_QRT_Ct	19,69 ± 2,88
PS_miR15a_5p (Ct)	12,89 ± 1,73
PS_miR16_5p (Ct)	13,40 ± 1,70
PS_miR34a_5p (Ct)	13,31 ± 1,74
PS_miR125b_5p (Ct)	14,19 ± 1,90
PS_miR320a (Ct)	11,22 ± 1,84
PS_miR320b (Ct)	16,10 ± 2,53
Plas_miR15a_5p (Ct)	19,47 ± 2,56
Plas_miR16_5p (Ct)	16,10 ± 1,89
Plas_miR34a_5p (Ct)	19,68 ± 3,16
Plas_miR125b_5p (Ct)	20,09 ± 3,24
Plas_miR320a (Ct)	19,59 ± 3,27
Plas_miR320b (Ct)	19,65 ± 3,01

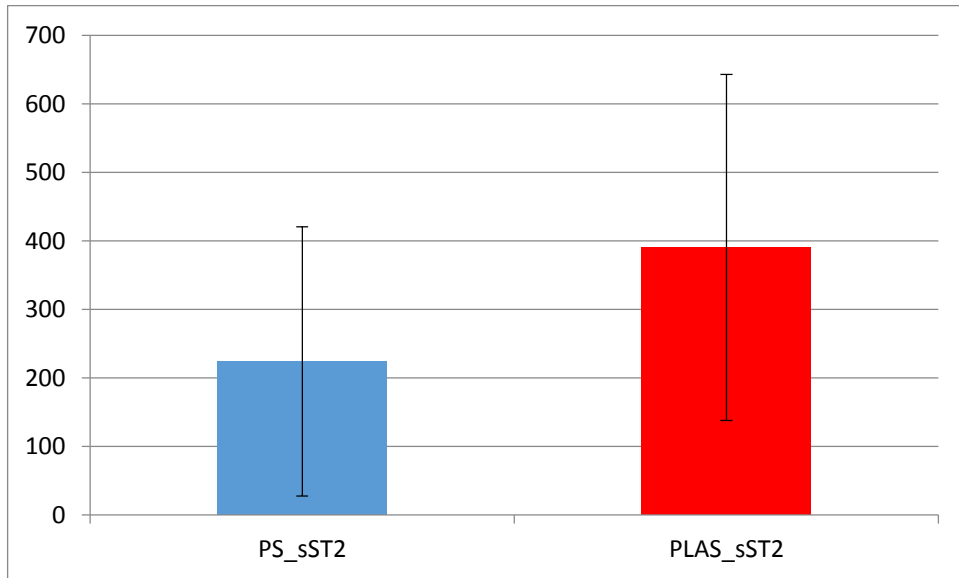
4.2. PS ve Plazmada sST2 Eliza Sonuçları

PS ve Plazmada ELİSA yöntemi ile sST2 tayini için ticari sST2 kiti kullanılarak optik yoğunluğun 450 nm’de okutulması ile elde edilen PS ve plazma sST2 düzeylerine göre oluşan sST2 standart doğrulama grafiği Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. sST2 standart doğrulama grafiği

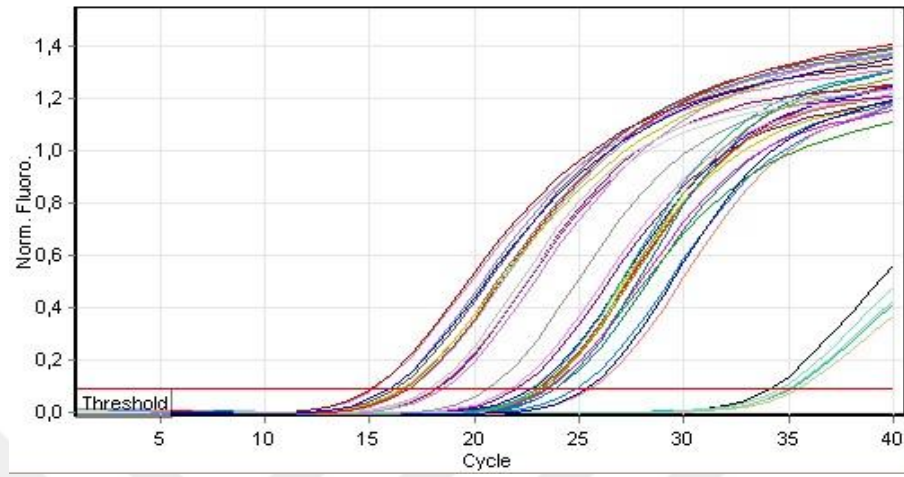
ELİSA ile PS’de ortalama sST2 düzeyi 223.992 ng/ml çıkarken, plazmada ortalama sST2 düzeyi 390.357 ng/ml çıkmıştır (Şekil 4.2). PS ve Plazma için ikili grupların istatistik analizinde Shapiro-Wilk tanıttıcı istatistik testi yapılarak Mann Whitney U testi kullanıldı. Bunun sonucuna göre PS’deki sST2 seviyesi Plazmaya göre düşük çıkmış olup bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.0020).



Şekil 4.2. PS ve Plazmada sST2 ELİSA sonuçlarının ng/ml cinsinden ortalama değerleri (PS: 223.992 ng/ml, Plazma: 390.357 ng/ml)

4.3. PS ve Plazmada ST2 Gen İfade Sonuçları

PS ve Plazmada ST2 gen ifadesinin normalizasyonu yapılırken housekeeping gen olarak Beta Actin kullanılmış olup qRT-PCR döngü değerleri Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. ST2 qRT-PCR döngü değerleri

PS ve Plazmada ST2 gen ifadesi analizinde her bir numuneye ait elde edilen Ct değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. PS ve Plazmada her bir numuneye ait ST2 Ct değerleri

ST2 (Ct)			ST2 (Ct)		
Numune	PS	Plazma	Numune	PS	Plazma
1	12,86	17,33	15	13,2	21
2	11,86	14,12	16	13,49	15,38
3	12,17	17,96	17	13,37	22,1
4	12,96	15,79	18	13,62	22,1
5	14,21	20,1	19	12,87	23,53
6	13,48	15,51	20	13,04	20,01
7	14,14	22,1	21	13,06	20,1
8	13,65	22,55	22	13,14	22,1
9	13,8	20,1	23	13,07	22,68
10	14,14	20,01	24	13,07	22
11	14,24	15,56	25	13,16	20
12	13,56	20	26	13,5	22,1
13	13,86	15,38	27	12,59	20,1
14	13,93	22,1			

Elde edilen verilerin istatistikleri için Qiagen Data Center Analysis web sayfası (<https://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>) kullanıldı. İlgili web sayfasında kontrol grubu olarak Plazma, çalışma grubu olarak PS seçildi. Böylece PS ile Plazmanın karşılaştırılması sağlandı. İlgili web sayfasında değerler sisteme girilirken preamplifikasyon seçeneği işaretlenerek analiz yapılmıştır. sST2 gen ifade verilerinin ilgili web sayfasında sisteme girilmesinden sonra elde edilen ortalama (Average-AVG) Ct, AVG Delta Ct, $2^{(-\text{Avg.}(\text{Delta}(\text{Ct})))}$, kat değişim (Fold Change) ve p değerlerine ait istatistiksel sonuçlarının tümü Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Elde edilen kat değişim ve p değeri PS'nin Plazma ile kıyaslanması sonucuna göre elde edilen değerdir.

Tablo 4.4. PS ve Plazmadaki sST2'nin gen ifadesinin istatistiksel sonuçları

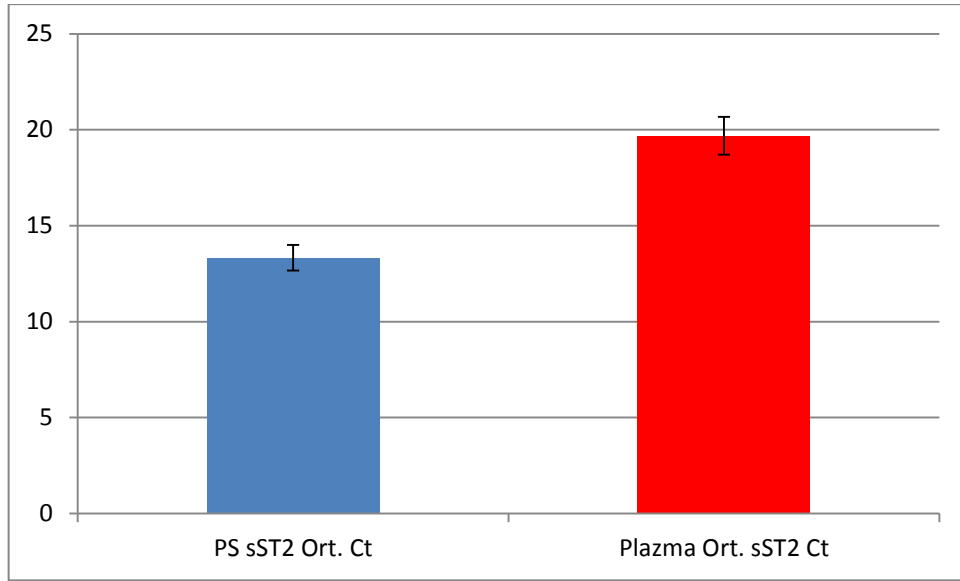
	Ort. Ct		Ort. Delta (Ct)*		$2^{(-\text{Avg.}(\text{Delta}(\text{Ct})))}$		Kat değişim= PS/Plas.	Kat azalma düzeyi= PS/Plas.	p**
sST2	PS	Plas.	PS	Plas.	PS	Plas.	Fold Change= PS/Plas.	Fold Down Regulation= PS/Plas.	p**
	13.33	19.69	0.79	-0.39	0.57	1.31	0.44	-2.27	0.000265

GOI: Gene of Interest, HKG: Housekeeping Genes, PS: Perikardiyal sıvı, Plas.: Plasma

*AVG Delta (Ct) = (Ct (GOI) - Avg Ct (HKG))

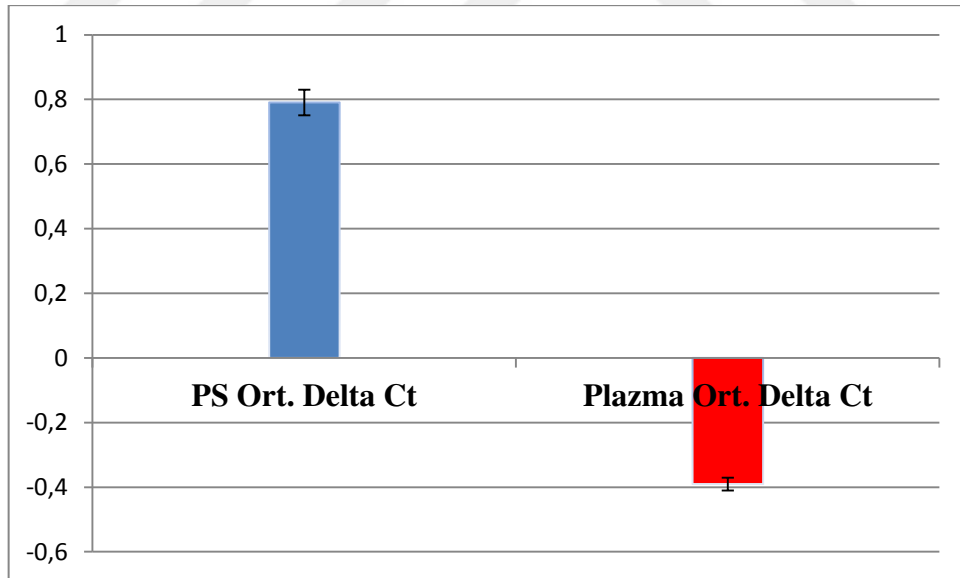
** PS'nin Plazma ile kıyaslanması sonucuna göre elde edilen p değeri

Aynı web sayfasında $2^{(-\text{Delta}(\text{Ct}))}$ değerleri için Student-t testi yapılarak PS ve plazmadaki sST2'nin gen ifade düzeylerinin kat değişimleri değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda ortalama Ct değeri PS'de 13.33, plazmada ise 19.69 olarak bulundu (Şekil 4.4). Buna göre Plazma ile karşılaştırıldığında PS'de ortalama Ct değeri daha düşük çıkmıştır.



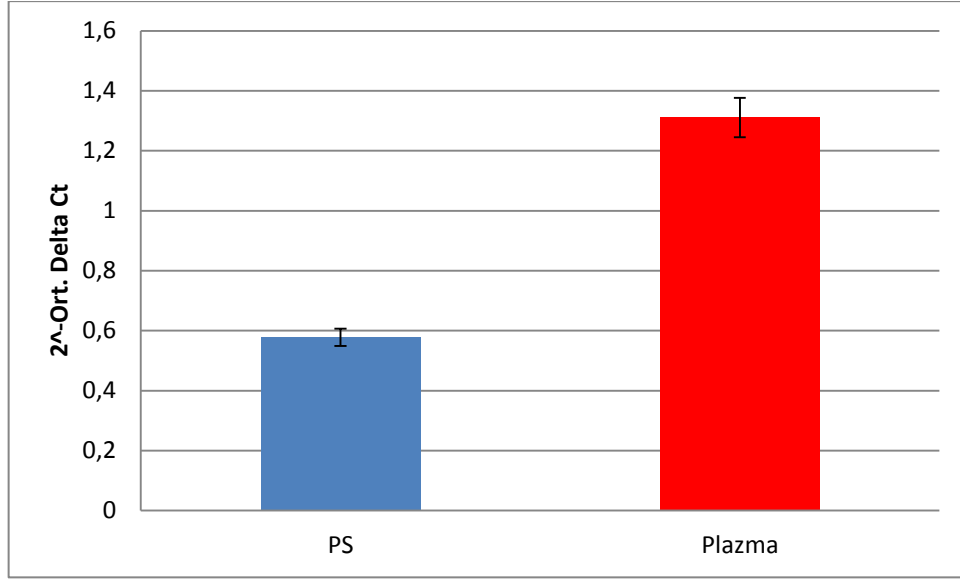
Şekil 4.4. PS ve Plazmada sST2 ortalama Ct değerleri (PS: 13.33, Plazmada: 19.69)

Yapılan istatistikte sST2 ortalama Delta Ct değerleri PS’de 0.79, plazmada ise -0.39 çıkmıştır (Şekil 4.5). Buna göre PS’de sST2 ortalama Delta Ct değeri Plazmaya göre yüksek çıkmıştır.



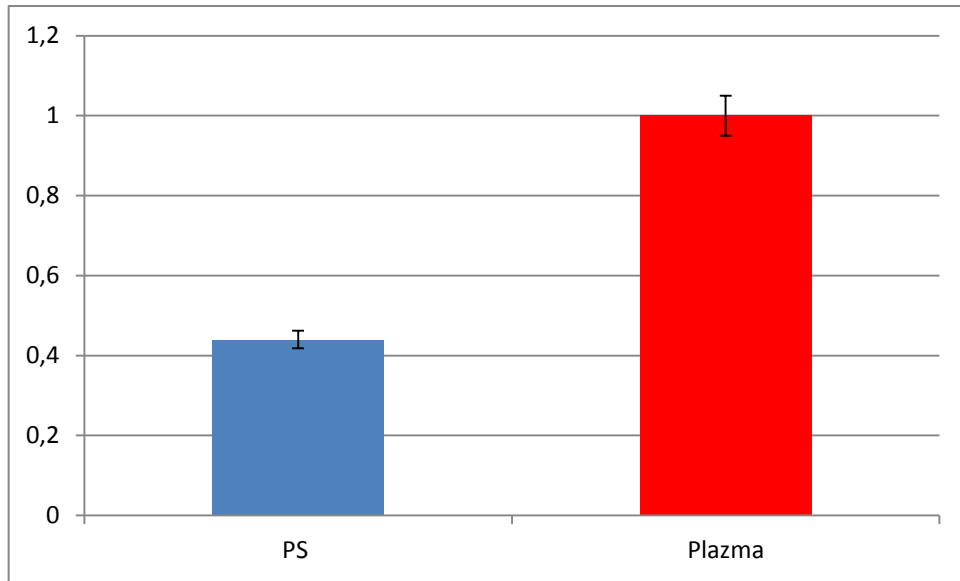
Şekil 4.5. PS ve Plazmada sST2 ortalama Delta Ct değerleri (PS: 0.79, Plazma: 0.39)

PS’de sST2 için $2^{(-\text{Ort.Delta Ct})} = 0.57$ bulunurken, plazmada sST2’nin $2^{(-\text{Ort.Delta Ct})} = 1.31$ bulunmuştur (Şekil 4.6). Buna göre PS’de $2^{(-\text{Ort.Delta Ct})}$ değeri plazmaya göre daha düşük çıkmıştır.



Şekil 4.6. PS ve Plazmada sST2'nin ortalama $2^{(-\text{Ort. Delta Ct})}$ değerleri (PS: 0.57, Plazma:1.31)

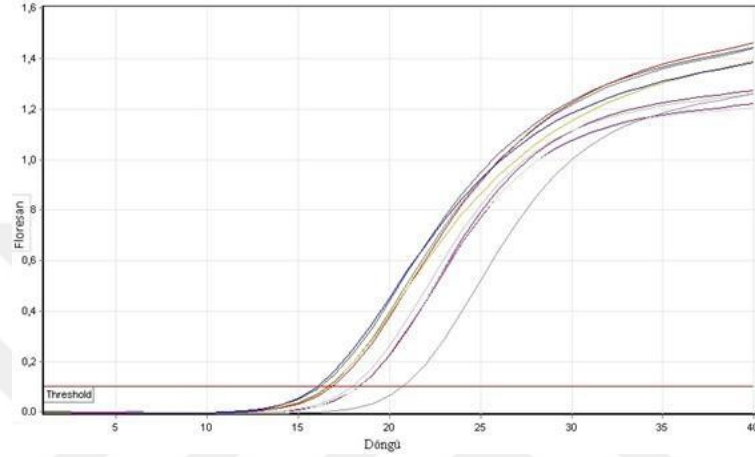
PS'deki kat değişim ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) sonucu Plazmada kat değişim ile kıyaslandığında (PS/Plazma) 0.44 değeri hesaplanmıştır (Şekil 4.7). Buna göre PS'de sST2 gen ifadesi Plazmaya göre 2.27 kat daha düşük çıkmıştır. PS ve Plazmadaki her bir ST2 gen ifadesi için tekrarlayan (replicate) $2^{(-\text{Delta Ct})}$ değerlerinin Student's t-test kullanılarak hesaplanması sonucunda ise; PS'de ST2 gen ifadesi plazmaya göre düşük çıkmış olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.000265$).



Şekil 4.7. PS ve Plazmada sST2'nin kat değişim değerleri (PS/Plazma: 0.44)

4.4. PS ve Plazmada miRNA Gen İfade Sonuçları

miRNA ifade sonuçları qRT PCR yöntemiyle ölçülmüştür. Çalışmaya alınan bütün numunelerde miRNA ifade düzeyleri tespit edilmiştir. miRNA ifadesinin normalizasyonu yapılırken Qiagen web sayfasında housekeeping gen verileri istenmemiş, bunun yerine global gen verileri kullanılmış olup qRT-PCR döngü değerleri Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. miRNA qRT-PCR döngü değerleri

PS ve Plazmada miRNA gen ifadesi analizinde her bir numuneye ait elde edilen Ct değerleri Tablo 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4.5. PS ve Plazmada herbir numuneye ait 6 miRNA'nın Ct değerleri

	miR15a-5p		miR16-5p		miR320a		miR125b-5p		miR34a-5p		miR320b	
	PS	Pla.	PS	Pla.	PS	Pla.	PS	Pla.	PS	Pla.	PS	Pla.
1	12,01	19,41	11,98	16,22	10,32	24,14	14,14	23,1	14,56	23,28	15,5	24,51
2	16,49	15,09	15,76	11,39	11,85	18,9	17,54	13,15	15,95	19,9	14,9	19,9
3	14,66	19,21	13,32	19,6	10,2	20,21	15,75	22,1	14,97	22,1	16,2	19,1
4	16,01	18,76	17,66	12,21	12,42	19,5	17,85	12,81	16,5	20,1	15,1	16,84
5	15,02	19,77	15,7	16,06	10,37	19,5	14,57	23,52	15,76	20,4	13,1	21,18
6	10,03	17,49	12,09	15,28	11,12	15,47	13,31	22,1	12	16,96	12,9	20,8
7	13,01	17,53	10,75	18,9	10,68	19,9	13,1	21,1	14,3	20,3	11,7	23,81
8	14,44	22,99	13,35	16,1	10,33	24,03	14,03	17,47	12,22	23,75	11,6	19
9	10,02	20,31	13,37	16,73	10,55	20,61	13	22,7	11,89	24,22	15,1	18,33
10	12,9	20,54	11,18	17,29	10,11	20,53	13,5	22,5	13,56	22,42	19,1	17,36
11	11,1	19,09	12,73	16,57	10,8	16,07	13,04	19,15	11,79	17,07	13,1	23,2
12	11,88	19,23	11,98	16,2	10,82	19,6	11,88	21	10,84	21,1	18,5	19,8
13	10,35	20,7	12,56	13,6	10,01	14,66	13,89	14,53	12,68	15,56	19,4	11,78
14	13,43	19,2	12,46	17,5	10,69	22,21	12,49	22,1	12,57	19,9	13,7	19,69
15	11,01	14,68	13,09	12,47	10,15	15,5	14,22	13,09	12,35	19,8	17,3	18,5
16	12,94	19,23	13,22	17,05	10,28	26,19	13,8	21,59	12	16,82	19,4	16,86
17	13,37	15,72	13,92	16,5	10,86	17,83	14,26	18,04	12,51	21,02	18,4	21,04
18	12,7	19,24	14,26	15,5	16,79	21,38	19,06	22,8	16,74	21,16	16,6	18,81
19	11,7	19,23	11,06	16,4	10,8	19,8	13,5	21,31	13,18	19,01	19,9	18,61
20	12,95	20,96	16,02	15,2	11,23	22,12	16,18	19,64	13,46	14,44	16,1	15,07
21	14,05	19,21	14,1	16,2	10,91	19,9	14,12	21,99	12,35	10,15	16,7	16,5
22	14,79	25,95	14,69	16,7	10,57	20,1	15,49	20,18	13,53	20,47	19,4	24,41
23	11,03	26,18	12,31	18,2	10,89	10,91	12,1	22,4	10,76	22,82	13,1	21,54
24	14,5	19,25	16,2	18,1	10,86	20,86	14,86	22,5	12,79	21,9	18,7	24,32
25	12,1	18,41	13,07	16,5	10,85	16,19	10,4	22,38	12,52	16,51	14,8	17,8
26	13,46	19,24	13,14	15,9	17,89	19,8	14,88	20,71	16,39	21,9	17,5	19,8
27	12,17	19,21	11,86	16,4	10,63	23,23	12,24	18,58	11,44	18,39	16,9	22,11

Elde edilen verilerin istatistikleri için Qiagen Data Center Analysis web sayfasında kontrol grubu olarak Plazma, çalışma grubu olarak PS seçildi. İlgili web sayfasında değerler sisteme girilirken preamplifikasyon seçeneği işaretlenerek analiz yapılmıştır. İlgili web sayfasında miR15a-5p, miR16-5p, miR320a, miR125b-5p, miR34a-5p ve miR320b gen ifade verilerinin sisteme girilmesinden sonra elde edilen Ortalama (Average-AVG) Ct, $AVG \Delta Ct, 2^{(-Avg.(Delta(Ct)))}$, Kat değişim (Fold Change) ve p değerlerine ait istatistiksel sonuçlarının tümü Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Elde edilen kat değişim ve p değeri PS'nin Plazma ile kıyaslanması sonucuna göre elde edilen değerdir.

Tablo 4.6. PS ve Plazmadaki 6 miRNA'ya ait gen ifadesinin istatistiksel sonuçları

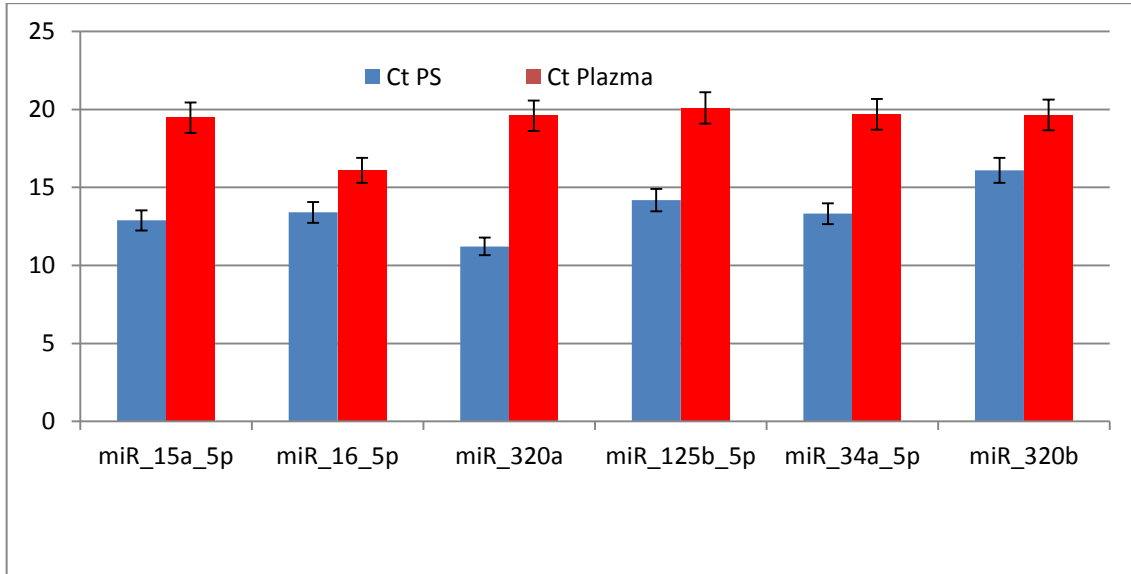
	Ort. Ct		Ort. Delta (Ct)*		$2^{\Delta(-\text{Avg}(\text{Delta}(\text{Ct}))}$		Kat değişim = PS/Pla.	Kat artma veya azalma düzeyi=PS/Pla.	P**
	PS	Pla.	PS	Pla.	PS	Pla.	Fold Change PS/Pla.	Fold Regulation= PS/Pla.	P**
miR15a-5p	12.89	19.48	-0.62	0.37	1.54	0.77	2.00	2.00	0.283504
miR16-5p	13.4	16.1	-0.12	-2.9	1.08	7.99	0.14	-7.35	0.000014**
miR320a	11.22	19.6	-2.29	0.49	4.92	0.70	6.95	6.95	0.442233
miR125b-5p	14.19	20.09	0.67	0.99	0.62	0.50	1.25	1.25	0.129741
miR34a-5p	13.32	19.68	-0.20	0.58	1.15	0.66	1.72	1.72	0.324842
miR320b	16.1	19.65	2.57	0.55	0.16	0.68	0.25	-4.07	0.00814**

GOI: Gene of Interest, HKG: Housekeeping Genes, PS: Perikardiyal sıvı, Plas.: Plasma

*AVG Delta (Ct) = (Ct (GOI) - Avg Ct (HKG))

**PS'nin Plazma ile kıyaslanması sonucuna göre elde edilen p değeri

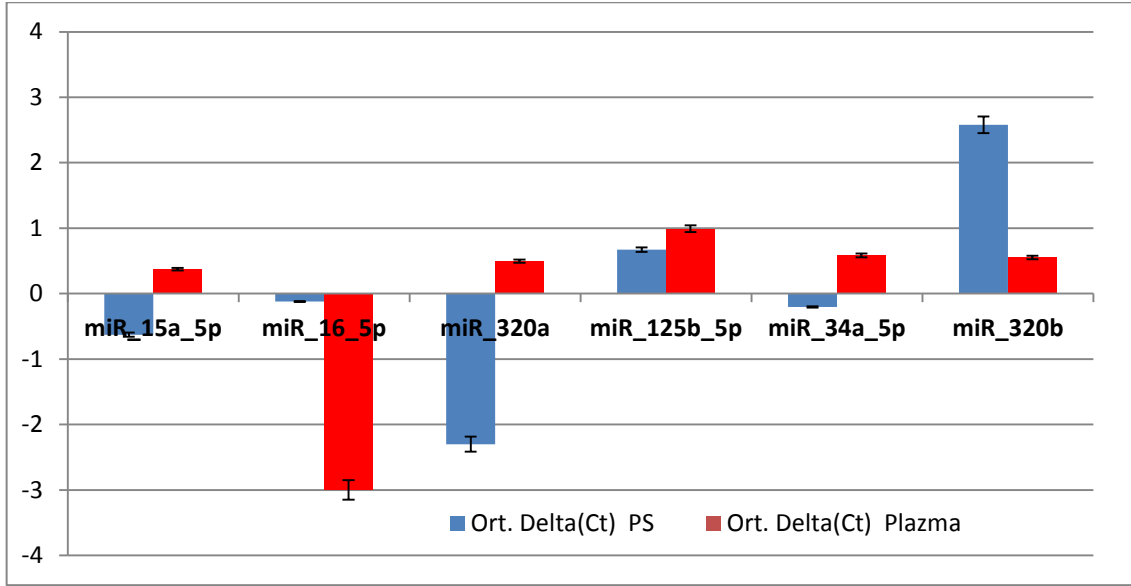
PS ve Plazmada ifade düzeyi tespit edilen miRNA'ların ortalama Ct değerleri hesaplanmış olup her bir miRNA'ya ait olan ortalama Ct değerleri Şekil 4.9'da verilmiştir. Buna göre PS'de tüm miRNA'ların ortalama Ct değerleri Plazmaya göre daha düşük çıkmıştır.



Şekil 4.9. PS ve Plazmadaki miRNA'ların Ort. (AVG) Ct değerleri

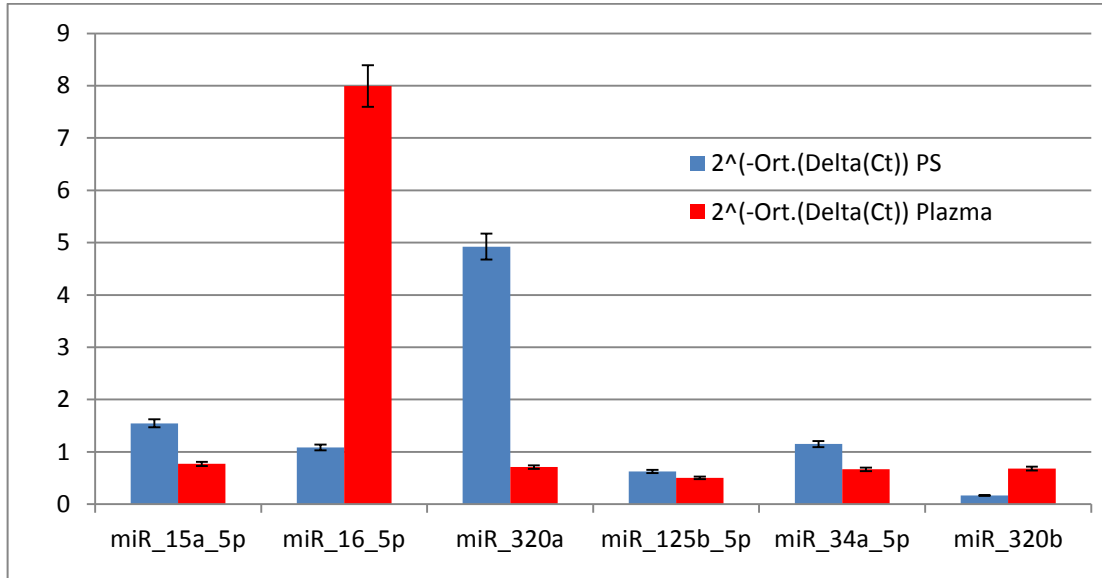
PS ve Plazmada ifade düzeyleri belirlenen miRNA'ların Ort. (AVG) Delta Ct değerleri hesaplanmış olup her bir miRNA'ya ait olan değerler Şekil 4.10'da verilmiştir. Buna

göre PS’de miR 16-5p ve miR-320b’nin Ort. (AVG) Delta Ct değerleri Plazmaya göre daha yüksek çıkarken diğer miR’ler daha düşük çıkmıştır.



Şekil 4.10. PS ve Plazmada miRNA’ların Ort. (AVG) Delta Ct değerleri

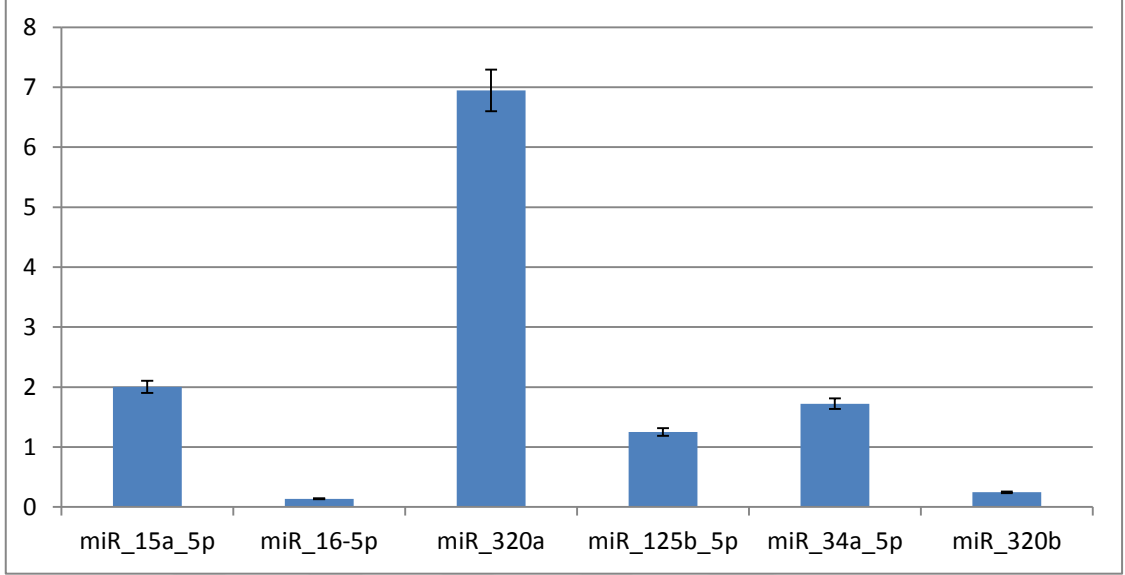
PS ve Plazmada ifade düzeyleri belirlenen miRNA’ların $2^{(-\text{Ort.}(\text{Delta}(\text{Ct})))}$ değerleri Şekil 4.11’de verilmiştir. Buna göre PS’de miR 16-5p ve miR-320b’nin $2^{(-\text{Ort.}(\text{Delta}(\text{Ct})))}$ değerleri Plazmaya göre daha düşük çıkarken diğer miR’ler daha yüksek çıkmıştır.



Şekil 4.11. PS ve Plazmada miRNA’ların $2^{(-\text{Ort.}(\text{Delta}(\text{Ct})))}$ değerleri

PS’nin Plazma ile kıyaslanması sonucunda PS’deki miRNA’lar için elde edilen kat değişim (Fold change) sonucunda; miR15a-5p için 2.00, miR16-5p için 0.14, miR320a

için 6.95, miR125b-5p için 1.25, miR34a-5p için 1.72 ve miR 320b için 0.25 değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.12). Buna göre en düşük kat değişim oranı miR16-5p ile miR 320b’de olmuştur.



Şekil 4.12. PS’nin Plazma ile kıyaslanması sonucunda PS’deki miRNA’lar için elde edilen kat değişim sonuçları.

PS ve Plazmadaki her bir miRNA gen ifadesi için tekrarlayan (replicate) $2^{(-\Delta \text{Ct})}$ değerlerinin Student's t-test kullanılarak hesaplanması sonucunda; PS’de Plazmaya göre;

miR15a-5p için $p=0.283504$

miR16-5p için $p=0.000014$

miR320a için $p=0.442233$

miR125b-5p için $p=0.129741$

miR34a-5p için $p=0.324842$

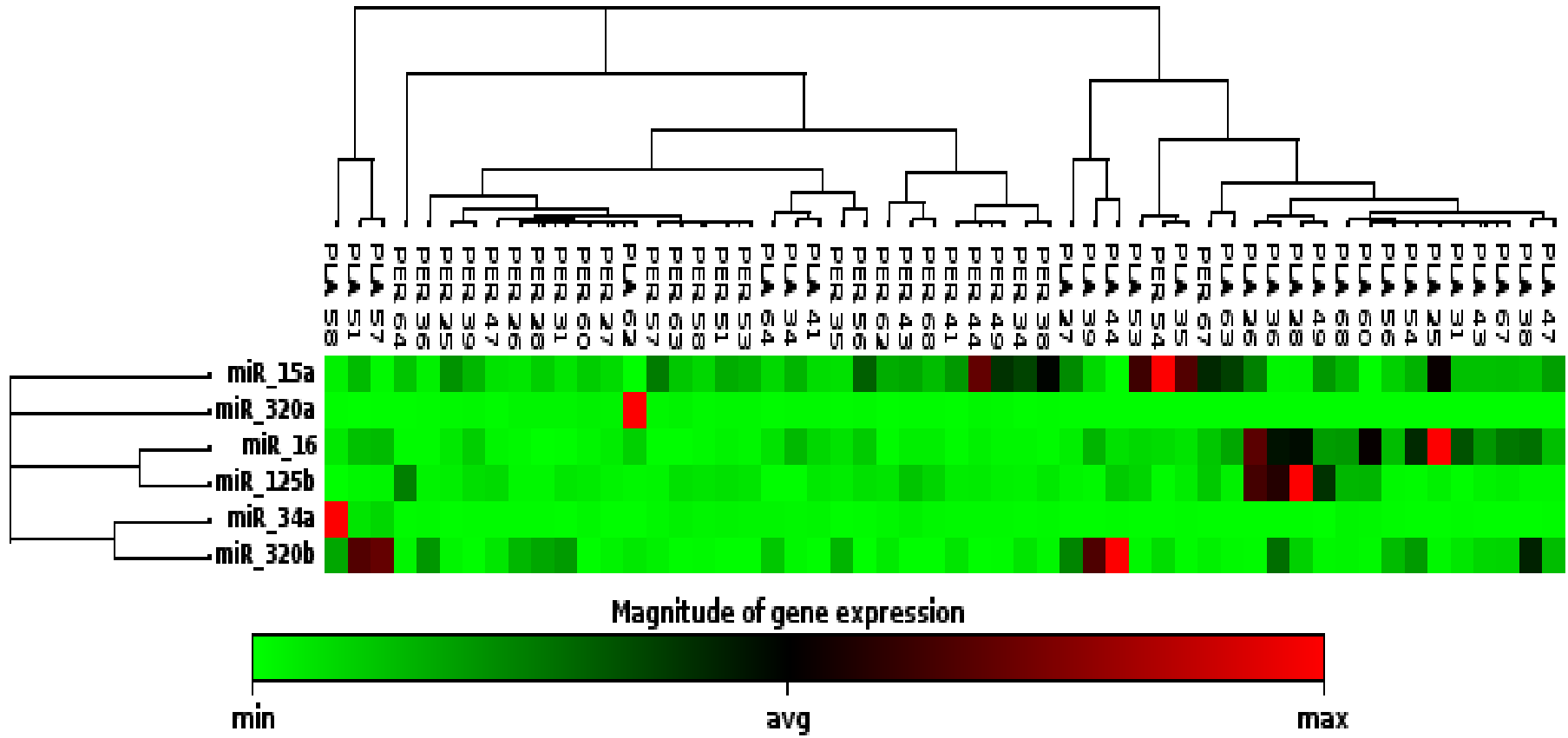
miR320b için $p=0.00814$ olarak bulunmuştur. Bunun sonucunda Plazmaya göre PS’de -7.35 kat daha düşük ifade edilen miR16-5p ile -4.07 kat daha düşük ifade edilen miR320b istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p=0.000014$ ve $p=0.00814$).

PS ve Plazmada miR15a-5p, miR16-5p, miR320a, miR125b-5p, miR34a-5p ve miR320b ile ST2 arasındaki ilişkiyi saptamak üzere yapılan istatistiksel analiz neticesinde ise sadece plazmada miR34a-5p ile plazma ST2 arasında negatif korelasyon

bulunmuştur ($r = -0.399$, $p = 0.039$). Diğer miRNA'lar ile ST2 arasında herhangi anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır.

PS ve Plazmada tespit edilen miRNA'ların gen ifadesinin teke tek iki boyutlu bir grafik üzerinde farklı renklerle işaretlenmesiyle oluşan Heatmap (ısı haritası) grafiği Şekil 4.13'te gösterilmiştir.





Şekil 4.13. PS ve Plazmadaki miRNA'ların Heatmap grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

KAH ani gelişen bir hastalık olmayıp, patolojik bulgular zamanla ortaya çıkabilmekte, hastalık kendini göstermeden önce hücrelerin içinde, dışında, hücreler arası boşlukta veya vücut sıvılarında çeşitli madde, molekül, protein vb. etmenlerde değişimler olmaktadır. Bu değişimlerde son dönemde miRNA'lar ve ST2 dikkat çekmekte ve bunlar biyobelirteç olarak kullanılabilmektedir. ST2 ve miRNA'lar iyi bir biyobelirteç olma yolunda olmasına rağmen bazı eksikliklerden dolayı soru işaretleri bulunmaktadır. Örneğin KAH ilişkili bazı miRNA'ların hem kalp kasında hem de iskelet kasından ifade edilmesi karmaşıklığa yol açmaktadır. Bu sorunun ortadan kalkması için dokuya özgün bölgede, hücre bazında ve doku sıvılarında çalışma yapılması önemlidir. Örneğin PS içerisindeki birçok madde, molekül, protein, hormon vb. değişimler kalp dokusundaki durum hakkında net bilgiler vermektedir.

KAH'ta miRNA'ların rolü ve prognozda ST2 seviyesinin belirleyiciliği henüz yeni keşfedilmiş olup KAH'ın gelişiminde ve seyrindeki rolü yeterince bilinmemektedir. Bu iki etmenin miyokard dokusundaki metabolizma ile ilgili rolü keşfedilmeye açıktır. Bu keşfedilme sürecinde KAH'ın önlenmesi ve tedavisi için bazı miRNA'ların ve ST2'nin biyobelirteç ya da moleküler hedef olma olasılığı da yüksektir. KAH'ta ST2 ve miRNA ile ilgili yapılan çalışmalar tam olarak standardize edilmediğinden farklı sonuçlar çıkabilmektedir. Bundan dolayı çalışma sayısının artması ve ortaya standart bir protokolün çıkarılması gerekmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar perikardı yeni tedavi yöntemlerinin uygulama alanı haline getirmektedir. Tıpkı perkütan ve cerrahi revaskülarizasyon şansı olmayan hastalarda kollateral damar gelişimini uyarmak için intraperikardiyal basic fibroblast growth faktör verilmesine benzer bir şekilde perikardiyal boşluğa miRNA türevlerinin (mimic veya antagomir) uygulanmasını ve sST2'nin düşürülmesini sağlayan tedavilerin yapılması hastaları ölümcül durumlardan kurtarabilir. Böylece bu amaca yönelik olarak yapılacak in vitro çalışmalar kliniğe uygulanabilir yeni tedavi yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Örneğin yapılan bir çalışmada; İntravenöz antagomir uygulaması ile miR-92a'nın inhibisyonu hem yeni kan damarları oluşumunu hem de iskemi ve myokardiyal infarksiyon modellerindeki hasara uğramış dokularda işlevsel bir iyileşme sağlamış olup, bu özelliğinden dolayı miR-92a inhibisyonu iskemik

kalp hastalığı ve periferik arter hastalıklarının tedavisi için yeni bir araştırma alanı oluşturmuştur.

Yapılan çalışmamız hastalıklarda teşhis ve hastalığın seyri için sadece bir çeşit materyalin varlığına bağlı kalmadan, hastalığın tanısal ve tedavisel süreçlerinin sağlıklı ve sistematik bir şekilde sürdürebilmesi ile geliştirilebilmesine katkı sunmaktadır. Bu konuda geleneksel olarak kan dışında PS'nin kullanılmasının önemi haizdir. Kalp damar hastalıklarında iki değişik materyal kullanarak tanı ve tedavi süreçlerine göre hastalığın sağlıklı bir şekilde ele alınması, yürütülmesi ve şu anda var olan durumun geliştirebilmesi önemli olup çalışmamız bu yönde bir eksikliğin giderilmesine ön ayak olmuştur.

Çalışmamızda ELİSA yöntemiyle sST2 düzeyi ile ilgili elde ettiğimiz sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarda ortaya çıkan “35 ng/ml üzerindeki sST2 değeri olumsuz kardiyovasküler hastalıklar oluşturur” öngörüsünü desteklemektedir (210). Çünkü çalışmaya dahil edilen hastaların hepsi zaten olumsuz kardiyovasküler durumlardan dolayı ameliyat olmuş olup hepsinin sST2 değeri 35 ng/ml'nin çok üstünde çıkmıştır. Yapılan çalışmamızda ELİSA ile ortalama sST2 değeri PS'de normalin 7 katı (223.992 ng/ml), Plazmada ise normalin 11 katı (390.357 ng/ml) daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlara göre PS'deki sST2 seviyesi Plazmaya göre düşük çıkmış olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0020$). Çalışma yapılmadan önce sST2 düzeyinin plazmaya göre PS'de daha yüksek çıkması bekleniyordu. Fakat sST2'nin PS'de daha düşük çıkmasının sebebi; PS'de sadece kalpten üretilen sST2 var iken, plazmada kalp dışında başka organlardan da sST2'nin üretilmesi olabilir. Ama yine de sST2'nin PS'de ortalama 7 kat fazla düzeyde tespit edilmesi bu parametrenin kalp hastalıkları için prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörüsünü güçlendirmektedir.

sST2'nin plazmada daha yüksek çıkmasının sebepleri hakkında yaptığımız araştırmalar farklı bilgilerin açığa çıkmasını sağlamıştır. Daha önceleri kardiyovasküler hastalıklarda sST2'nin kaynağının miyokard kaynaklı olduğu tespit edilmiş ve bu durum in vitro olarak neonatal rat kardiyomiyositlerinde ST2 mRNA'sının artmasıyla gösterilmiştir (204). Ancak Bartunek ve ark. artmış kalp hipertrofisi ve konjestif kardiyomiyopatide yüksek sST2 düzeylerinin tek kaynağının erişkin insan miyokardı olmadığına dair ilk kanıtı sağlamıştır. Buna ek olarak in vitro olarak venöz ve arteriyel endotel hücrelerinin IL-1b, tümör nekroz faktörü (TNF α) ve forbol ester uyarımı sonrasında sST2 proteinini

salgılama kabiliyetine sahip olduğunu belgeleyen veriler bulunmaktadır (224). İmmünoşüpresif özelliklere sahip olan sST2 salgılanmasının inflamatuvar ilişkili hastalıklarda kuvvetli bir şekilde arttığı birçok çalışmada rapor edilmiş olup, klinik ortamda dang (dengue) virüs enfeksiyonu, sepsis ve travma, akciğer fibrozu (pulmoner fibrosiz), astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, romatoid artrit, kollajen vasküler hastalıklar, gıda allerjisi, subaraknoid hemoraji ve transplant vaskülopatisi geliştiren kalp allogrefti alan hastalarda sST2 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (242, 243, 244, 245).

Yaptığımız çalışmada PS'de sST2 gen ifade düzeyi plazmaya göre 2.27 kat daha düşük çıkmış olup bu durum istatistiksel açıdan anlamlı ($p=0.000265$) bulunmuştur. Bu durum çalışmamızdaki ELİSA sonuçlarına benzerlik göstermektedir. sST2'nin serum seviyelerinin kalp ve akciğer hastalıklarında yükseldiği bilinmesine rağmen sST2 / IL33 eksenini ve bunun tetikleyicileri ile organ dağılımı arasındaki ilişki hala bilinmemektedir (246). Normalde PS'de yüksek çıkması beklenen sST2 gen ifadesinin plazmada daha yüksek çıkmasının temel sebebi kalp dışındaki damar endoteli ve lökositleri içeren ekstramiyokardiyal (nonmiyokardiyal) kaynaklar olabilir (224). Yani ekstramiyokardiyal kaynaklar PS'ye göre plazmaya daha fazla sST2 salgılamış olabilir. Bu durumla ilişkili birçok çalışma yapılmış olup, örneğin daha önceki bazı çalışmalar IL33 / ST2 sinyalinin, pulmoner vasküler remodeling patogeneğinde etkilenebileceğini göstermiştir (247, 248). Yapılan bazı çalışmalarda sST2 artışının pulmoner arter hipertansiyon (PAH) hastalarında yükseldiği tespit edilmiştir. Carlomagno ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada PAH hastalarında ölçülen kötü sağ ventrikül (RV) yapısı ve fonksiyonun sST2 ile korele olduğu ortaya çıkmıştır (249). Shah ve ark. tarafından yapılan araştırmada ise dispne hastaları arasında sST2 konsantrasyonları RV fonksiyonuyla ilişkili bulunmuş olup, bu durumun uzun dönem mortaliteyi öngörebildiği sonucu çıkmıştır (250). Agoston-Coldea ve arkadaşları, kronik obstrüktif akciğer hastalığı nedeniyle sekonder pulmoner hipertansiyonlu hastalarda sST2 düzey artışının RV fonksiyon kaybıyla birlikte olduğunu göstermişlerdir (251). Yapılan başka bir çalışmada ise sST2'nin PAH'lı hastalarda prognozu tahmin etmede de önemli olabileceği belirtilmiştir (252). Geethani ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada insan periferik kan hücreleri ve fare kemik iliğinden türetilen ve sonrasında uyarılan mast hücrelerinin sST2'yi eksprese ettiği ortaya çıkmıştır (253). M. Mildner ve ark. tarafından yapılan primer hücre kültürü çalışmasında en güçlü sST2 mRNA ifadesi kalpte ve akciğer dokusunda tespit edilmiş olup bu durum in vitro koşullarda sST2

proteininin spontan sekresyonuyla korele bulunmuştur (246). Bu sonuçlar sST2 sekresyonunda birincil kaynakların kalp ve akciğer olmasına rağmen hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda sST2'nin inflamatuvar tetikleyiciler arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Birçok çalışma sST2 ile diyastolik yük endeksleri arasındaki ilişkiye dayanarak, vasküler endotelin hemodinamik ve inflamatuvar durumu algıladığını ve dolayısıyla sST2'yi dolaşıma soktuğunu varsaymaktadır. Mevcut literatürlerden yola çıkarak sST2'nin klinik kalp yetmezliği teşhisinde belirgin bir role sahip olduğuna ve insanlardaki bağışıklık durumuyla ilişkili olduğuna karar verilebilir. Yaptığımız bu çalışmada ameliyata alınan hastalarda inflamatuvar etkenlerin plazmada sST2 seviyesini PS'ye oranla daha fazla artırmış olabileceğini düşündürmektedir.

İnsan primer bronşiyal epitel hücreleri (HBEC'ler), CD4 lenfositleri, CD8 lenfositleri, eozinofiller ve mast hücrelerinin kültür ortamında D vitamininin varlığı ve yokluğuyla yapılan bir çalışmada D vitamininin çözünür sST2 üretimini arttırdığı, IL33'ün etkisini inhibe ettiği ortaya çıkmıştır (254). Paul E ve ark. tarafından yapılan bu çalışmaya göre vitamin D seviyesinin yüksek olduğu hastalarda PS'ye oranla plazmada sST2 seviyesi yüksek çıkmış olabilir. Bu durumda ekstramiyokardiyal sST2 kaynağını desteklemektedir. Bu durumu net ortaya çıkarabilmek için ileride yapılacak çalışmalarda koroner arter hastalarında vitamin D ile sST2 seviyesi ilişkisi çalışılabilir.

Yapılan bir başka çalışmadan elde edilen veriler bakteriyel ve viral enfeksiyon varlığında bronş epitelyal hücreler tarafından sST2 üretiminin artırıldığını göstermiştir (255). Bu durum bize plazmadaki sST2 seviyesinin PS'ye göre yüksek çıkmasının sebeplerinden birisinin akciğer, lenfosit, mast hücreleri, inflamatuvar süreçler ile vitamin D gibi birçok ekstramiyokardiyal kaynağın olduğunu göstermektedir. Örneğin aktif inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda da sST2 düzeyleri de artmaktadır (256, 257). Bu gibi durumlarda plazma sST2 seviyesi birçok doku ve organa bağlı artmasına rağmen PS'deki sST2 seviyesi ise sadece kalp kökenli olarak değişmektedir. Çünkü PS'ye sST2 geçişi sadece kendisine en yakın doku olan kalpten gelebilmektedir. Bu sebeple özellikle gelecekte olumsuz kardiyovasküler hastalıkların öngörüsünü belirten sST2 seviyesinin sadece plazmada bakılması çok net sonuçlar vermeyebildiğinden dolayı gerçek bir öngörünün belirlenebilmesi için sST2 seviyesinin hem plazmada hem de PS'de bakılması daha doğru olur. Örneğin yakın geçmişte, açık kalp cerrahisinde kalp-akciğer makinelerinin kullanımından sonra sST2 düzeylerinin

kalıcı bir şekilde arttığını tespit edilmiş (258, 259) olması plazma sST2 seviyesinin birçok etmenden dolayı değiştiğini göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada miRNA'ların gen ifade seviyelerinin değerlendirilmesinde Plazmaya göre PS'deki miRNA değişimi gözlenmiştir. PS'nin Plazma ile kıyaslanması sonucunda PS'de 7.35 kat daha düşük ifade edilen miR16-5p ile 4.07 kat daha düşük ifade edilen miR320b istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p=0.000014$ ve $p=0.00814$). Daha önce yapılan bir araştırmada PS'ye özgü altı mikroRNA'dan biri olarak kabul edilen miR-320b HF veya diğer kardiyovasküler koşullarla ilişkilendirilmiş olup (21), farklı çalışmalara göre de AMI ile alakalı bulunmuş ve sonuç olarak kardiyovasküler hastalığın oluşumu, patogenezi ve mortalite riskini etkilediği tespit edilmiştir (190, 191, 192, 193). Yakın dönemde yapılan birçok çalışmada ateroskleroz ve koroner arter hastalığı gelişimi ile ilişkilendirilen (190, 194, 195) miR320b Suvi M. Kuosmanen ve ark. tarafından yapılan araştırmada kalp yetmezliğinden dolayı açık kalp cerrahisine alınan hastaların % 96'sının PS'sinde tespit edilmiş olup, 3.5 Average Cp-Assay Cp miktar değeriyle en çok bulunan ikinci mikroRNA olmuştur (21). Wang ve ark. çalışmasında miR320'nin endotel hücrelerine exosomal transferi yoluyla tip 2 diyabetik ratlarda bir anti-anjiyogenik etki gösterdiği ortaya çıkmıştır (260). Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda miR 320 miyokardiyal iskemiye neden olan ve kardiyomiyosit apoptozunu tetikleyen faktör olarak tespit edilmiştir (261). miR320b hakkında yaptığımız miRNA hedef etkileşim veritabanı "microRNA target interaction database" analizine göre miR320b'nin ST2'ye % 39-48 oranında bağlanabildiği tespit edilmiştir (200). Yapılan çalışmamızda da miR-320b tüm numunelerde tespit edilmiş olup ortalama Ct açısından PS'de en çok ifade edilen birinci miRNA, plazmada ise en çok ifade edilen üçüncü miRNA olmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda kardiyovasküler hastalıklar açısından olumsuz etkiye sahip olan miR320b'nin sST2 ile beraber yüksek seviyelerde bulunması bu durumu daha da güçlendirerek miR 320b'nin biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelini kuvvetlendirmektedir. Çalışmamız neticesinde sST2 ile miR320b'nin ifade seviyelerinin yüksek olması daha önceden miR320b hakkında tespit edilen anti-anjiyogenik etkisi koroner arterlerin gelişmesini ve dallanmasını önleyerek miyokardın beslenmesine olumsuz etki yapmış olabilir. Yine miR320'nin miyokardiyal iskemiye ve apoptoza neden olması kalp üzerine negatif bir baskıya neden olmuş olabilir. Bu sebepten dolayı koroner arter bypass cerrahisi geçiren hastalarda miR 320'nin yüksek ifadesi geçmiş bilgileri desteklemektedir.

Suvi M. Kuosmanen ve ark. tarafından yapılan araştırmada kalp yetmezliğinden dolayı açık kalp cerrahisine alınan hastaların tümünün PS'sinde miR-16-5p tespit edilmiş olup, en çok bulunan beş miRNA arasına girmiştir (21). Aynı çalışmada miR16-5p ayrıca 50 miRNA arasında Average Cp- Assay Cp miktar değeriyle beşinci olmuş ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. E.L. Vegter ve ark. tarafından yapılan araştırmada miR-16-5p kardiyak gösterge açısından olumsuz belirteç olan CRP ile pozitif ilişkili bulunmuştur (262). miR16-5p hakkında yaptığımız "microRNA target interaction database" araştırmalarına göre miR16-5p ST2'ye % 83 oranında bağlanabildiği tespit edilmiştir (200). Çalışmamızda ise miR16-5p tüm numunelerde tespit edilmiş olup ortalama Ct açısından PS'de en çok ifade edilen üçüncü miRNA, Plazmada ise en az ifade edilen miRNA olmuştur. PS ile Plazmanın karşılaştırılması sonucunda ise miR16-5p PS'de 7.3 kattan daha az ifade edilmiş olup bu durum istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Geçmiş dönemde yapılan çalışmalarda miR16-5p'nin CRP ile pozitif ilişkili bulunması kalp üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda kardiyovasküler hastalıklar açısından olumsuz etkiye sahip olan miR16-5p'nin plazmada sST2 ile beraber yüksek seviyelerde bulunması biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeline işaret etmektedir. Ortalama Ct değerlerine göre çalışmamızda tüm miRNA'lar PS'ye oranla plazmada daha yüksek çıkmıştır. Bunun sebebi tıpkı sST2'de olduğu gibi plazmaya nonmiyokardiyal kaynaklardan miRNA gen ifadesinin artırılması olabilir.

PS ve Plazmada miR15a-5p, miR16-5p, miR320a, miR125b-5p, miR34a-5p ve miR320b ile ST2 arasındaki ilişkiyi saptamak üzere yapılan istatistiksel analiz neticesinde ise sadece plazmada miR34a-5p ile ST2 gen ifadesi arasında negatif korelasyon bulunmuş ($r = -0.399$, $p = 0.039$) olup diğer miRNA'lar ile ST2 arasında herhangi anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Buna göre plazmada miR34a-5p ifadesi yüksek olan hastalarda ST2 ifadesi düşük çıkmıştır. Aslında çalışmaya dahil edilen miRNA'ların hepsi kısmı derecede ST2'ye bağlanabilme potansiyeline sahip olsa da çalışmamıza göre ST2'ye bağlanma potansiyeli en yüksek miR34a-5p olmuştur. Buna göre birçok çalışmada AMI ile ilişkili bulunan ve kardiyak fonksiyonda azalmaya katkı yapan bir faktör olarak tanımlanan miR34a-5p'nin (21) hücre kültürü çalışmalarında ST2'nin gen ekspresyonu üzerine etkisinin araştırılması daha iyi sonuçlar verebilecektir.

Her ne kadar çalışmamız bazı ilkleri içerisinde barındırsa da çalışmamızla ilgili çeşitli kısıtlamalar bulunmaktadır. İlk olarak klinik olarak sadece koroner arter hastaları çalışma kapsamına alındığından hasta sayısı sınırlı kalmıştır. İleri çalışmalarda daha çok hasta ile koroner arter hastalığına ek olarak diğer kardiyovasküler hastalıkların eklenebileceği çalışmalar yapılabilir. İkincisi etik olarak sağlıklı insanlardan PS alınmamasından dolayı PS’de sST2 düzeyleri için sağlıklı kontrol grubunun olmamasıdır. Bu durum hayvan çalışmaları ile desteklenebilir. Üçüncüsü çalışmada kullanılan plazmalar ameliyat öncesi alınan plazmalar olup, daha sonraki çalışmalarda ameliyat sonrasında plazma alınarak hastaların ameliyat öncesi ve sonrası plazma sST2 ve miRNA seviyeleri karşılaştırılabilir. Dördüncüsü KPB sırasında kanın non endotelial yüzeye değmesinin sST2 ve miRNA üzerindeki etkisi araştırılabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen verilerin ve istatistiklerin değerlendirilmesi neticesinde sST2’nin protein düzeyi ile gen ifadesi plazmaya göre PS’de anlamlı derecede daha düşük çıkmıştır. miRNA’ların gen ifadesinde ise miR16-5p ve miR320b plazmaya göre PS’de anlamlı derecede daha az ifade edilmiştir. miRNA’lar ile ST2 arasındaki ilişkide ise PS’de anlamlı bir ilişki bulunmazken sadece plazmada miR34a-5p ile ST2 arasında negatif anlamlı korelasyon bulunmuştur. Böylece çalışma öncesinde ‘‘sST2 ve miRNA’ların PS’de daha yüksek düzeyde çıkması gerekir’’ hipotezinin tersine bir sonuç elde edilmiştir. sST2’nin protein düzeyi ve gen ifadesi ile miR320b ve miR 16-5p’nin gen ifadesinin plazmaya göre PS’de düşük çıkmasının temel sebebi PS’ye ekstramiyokardiyal kaynakların ulaşmaması olabilir. Çünkü kalp dokusu dışında üretilen bir parametrenin PS’ye geçebilmesi çok zordur. Ayrıca daha önceki çalışmalarda sadece PS’ye özgü miRNA olarak tanımlanan miR320b çalışmamızda hem PS’de hem de plazmada tespit edilmiş olup bu mikroRNA’nın sadece PS’ye özgü olmadığı belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Onat A, Keleş I, Çetinkaya A. On yıllık Tekharf çalışması verilerine göre Türk erişkinlerinde koroner kökenli ölüm ve olayların plevalansı. Türk Kardiyoloji Derneği Arş.,2001;29:8-19.
2. Zipes Douglas P, Libby P, Robert Bonow O, Eugene B (Ed). Braunwald's Heart Disease, Textbook of cardiovascular medicine. 7th edition. Editör: Zipes Douglas P. 2012;p1243-1281.
3. Özkan Arat A. Akut koroner sendromlar: Epidemiyoloji, Türk Kardiyol Dern Arş- Arch Turk Soc Cardiology.2013;41 Suppl 1:1-3.
4. Kalozoumi G, Yacoub M, Sanoudou D. MicroRNAs in heart failure: Small molecules with major impact. Global Cardiology Science and Practice.2014;30.
5. Guo-Hua D, Pei-Ze M, Xian-Bo S, Ning L, Tong Z, Bo W. MicroRNA-223-3p Inhibits the Angiogenesis of Ischemic Cardiac Microvascular Endothelial Cells via Affecting RPS6KB1/hif-1a Signal Pathway. Plos One. October 2014. Volume 9, Issue 10, e108468.
6. Wang F, Chen C, Wang D. Circulating microRNAs in cardiovascular diseases: from biomarkers to therapeutic targets. Front. Med., 2014. 8(4): 404–418.
7. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. J Clin Invest.2007;117:1538–1549.
8. Spodick DH, Microphysiology of the pericardium: substrate forintra pericardial therapeutics Herz. 2000;25:720-723.
9. Angel L, Ferna'ndez A, Jose' B., Garc'ia-Bengocheaa, Julia'n A, Jose' R, Gonza'lez J. Biochemical markers of myocardial injury in the pericardial fluid of patients undergoing heart surgery. Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery 7. 2008;373–377.
10. Chiara C. Inflammation in cardiac disease: focus on Interleukin-33/ST2 pathway. Inflammation and Cell Signaling. 2014;1:e149.
11. Domingo A, Figal P, MD James L, Januzzi MD. The Biology of ST2: The International ST2 Consensus Panel. AmJ Cardiol;2015;115[suppl]:3Be7B.
12. Dieplinger B, Mueller T, Soluble ST2 in heart failure. Clinica Chimica Acta 2015;443, 57–70.
13. Moore SA, Januzzi JL Jr. Found in translation soluble ST2 and heart disease. J Am Coll Cardiol.2010;55:251e3.

14. Eggers KM, Armstrong PW, Califf RM. ST2 and mortality in Non ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Am Heart J*. 2010;159:788e94.
15. Rehman SU, Mueller T, Januzzi JL Jr. Characteristics of the novel interleukin family biomarker ST2 in patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:1458e65.
16. Mueller T, Dieplinger B, Gegenhuber A. Increased plasma concentrations of soluble ST2 are predictive for 1-year mortality in patients with acute destabilized heart failure. *Clin Chem*. 2008; 54:752e6.
17. Janika V, Claudia B, Arian F, Thomas T. Regulatory RNAs and paracrine networks in the heart, European Society of Cardiology. *Cardiovascular Research*. 2014;102, 290–301.
18. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. *Archives Medical Review Journal* 2015;24(4):472-493.
19. Bissels U, Bosio A, Wagner W. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica*. 2012;97:160-7.
20. Großhans H. Regulation of microRNAs. Springer Science Business Media, Eds. New York. 2010.
21. M. Kuosmanen S, Hartikainen J, Hippeläinen M, Kokki H, Liisa Levonen A, Tavi P. MicroRNA Profiling of Pericardial Fluid Samples from Patients with Heart Failure. *Plos one*. 2015;0119646.
22. Natarajan SK, Smith MA, Wehrkamp CJ, Mohr AM, Mott JL. MicroRNA function in human diseases. *Med Epigenet*. 2013;1:106-15.
23. Xiao YF, Yong X, Fan YH, Lü MH, Yang SM, Hu CJ. MicroRNA detection in feces, sputum, pleural effusion and urine: novel tools for cancer screening. *Oncol Rep*. 2013;30:535-44.
24. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*. 2009;15:5473-77.
25. Demyanets S, Kaun C, Pentz R, Krychtiuk KA, Rauscher S, Pfaffenberger S. Components of the interleukin-33/ST2 system are differentially expressed and regulated in human cardiac cells and in cells of the cardiac vasculature. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;60:16–26.
26. White PD. Angina pectoris: Historical Background In: Paul O. Angina pectoris, New York: Medcom Press, 1974:1-11.

27. Agneta S, Åsa C. Coronary artery disease/ physicalactivity in the prevention and treatment of disease, <http://fyss.se/wp-content/uploads/2011/06/21.-Coronary-artery-disease.pdf>. Erişim Tarihi: 03 Aralık 2017.
28. White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. *Lancet* 2008;372(9638):570-84.
29. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104(3):365-72.
30. Rosamond W, Flegal K, Furie K. Heart disease and stroke statistics 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2008; 117:e25.
31. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010; 121:948.
32. Onat A, Kahraman G, Ökçün B, Dönmez K, Keleş İ, Sansoy V. Türk Erişkinlerinde Ölüm ve Koroner Olaylar: TEKHARF Çalışması Kohortunun 5-Yıllık Takibi. *Türk Kardiyoloji Derneği Araştırmaları*. 1996;24(1):8-15.
33. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006; 367:1747.
34. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva World Health Organization. 2011.
35. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva World Health Organization. 2011.
36. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 2006; 3(11):e442.
37. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*. 2001; 104:2746.
38. Beaglehole R, Reddy S, Leeder SR. Poverty and human development: the global implications of cardiovascular disease. *Circulation* 2007; 116:1871.
39. Libby P, Bonow RO, Zipes, DP, Mann DL. Braunwald's Heart Disease. London: Saunders; 2007.
40. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2007; 28:2525.

41. Prinzmetal M, Kennamer R, Merliss R, Wada T, Bor N. Angina pectoris. I. Am J Med. 1959; 27:375-388.
42. Lanza GA. Cardiac syndrome X. A critical overview and future perspectives. Heart 2007;93:159-66.
43. Wallentin L. Akut kranskärlssjukdom. [Acute Coronary Artery Disease] Stockholm: Liber; 2005.
44. Davies MJ. The composition of coronary-artery plaques. N Engl J Med. 1997;336: 1312-4.
45. Roque M, Badimon L, Badimon JJ. Pathophysiology of unstable angina. Thromb Res 1999;95:V5-14.
46. Willems IE, Arends JW, Daemen MJ. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. J Pathol. 1996;179:321-5.
47. Lakshmanadoss U. Novel Strategies in Ischemic Heart Disease, Overview of Coronary Artery Disease, <http://www.intechopen.com/books/novel-strategies-in-ischemicheart-disease>, February 2012. Erişim tarihi: 19 Ocak 2018.
48. Libby P, Bonow R, Braunwald E, Zipes D. Pathophysiology of heart failure. Amsterdam: Elsevier; 2004.
49. Deedwania PC, Carbajal EV. Silent myocardial ischemia. A clinical perspective. Arch Intern Med 1991; 151:2373.
50. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: Stunning, preconditioning, and their clinical implications: Part 1. Circulation 2001; 104:2981.
51. Downey JM, Cohen MV. Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. Prog Cardiovasc Dis. 2006; 48:363.
52. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. Circulation 2008;117:2938–48.
53. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. Circ Res 2006;99: 1044–59.
54. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24: 1161–70.
55. Drouet L. Atherothrombosis as a systemic disease. Cerebrovasc Dis 2002;13 (Suppl.1):1-6.
56. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, O'Connor WN. Intimomedial interface damage and adventitial inflammation is increased beneath disrupted atherosclerosis in the aorta: implications for plaque vulnerability. Circulation 2002;105(21):2504-11.

57. Wang L, Jerosch-Herold M, Jacobs DR Jr., . Coronary artery calcification and myocardial perfusion in asymptomatic adults: the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1018–26.
58. Kalra SS, Shanahan CM. Vascular calcification and hypertension: cause and effect. *Ann Med* 2012;44 (Suppl) 1:S85–92.
59. Vliegenthart R, Oudkerk M, Hofman A. Coronary calcification improves cardiovascular risk prediction in the elderly. *Circulation* 2005;112:572–7.
60. Vavuranakis M, Toutouzas K, Stefanadis C. Stent deployment in calcified lesions: can we overcome calcific restraint with highpressure balloon inflations *Catheter Cardiovasc Interv.* 2001;52: 164–72.
61. Wong ND, Kouwabunpat D, Vo AN. Coronary calcium and atherosclerosis by ultrafast computed tomography in asymptomatic men and women: relation to age and risk factors. *Am Heart J.* 1994; 127:422–30.
62. Goel M, Wong ND, Eisenberg H. Risk factor correlates of coronary calcium as evaluated by ultrafast computed tomography. *Am J Cardiol* 1992;70:977–80.
63. Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA* 2004;291: 210–5.
64. Zoghi M, Nalbantgil I. Hypertension and endothelial dysfunction. *Anadolu Kardiyol Derg* 2002;2(2):142-7.
65. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12(4):383-9.
66. Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 2006;133(8):1543-51.
67. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(8):1983-92.
68. Landmesser U, Drexler H. The clinical significance of endothelial dysfunction. *Curr Opin Cardiol.* 2005;20(6):547-51.
69. Kumar A, Cannon CP. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. *Mayo Clin Proc.* 2009;84(10):917-38.
70. Hamm CW, Möllmann, H, Bassand JP, Van de Werf F. Acute Coronary Syndrom. In: Camm AJ, Lüscher TF, Serruys PW., *The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine.* 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2009. P535-97.

71. Bazzano LA, He J, Muntner P, Vupputuri S, Whelton PK. Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. *Ann Intern Med.* 2003;138(11):891-7.
72. Lamarche B, Lemieux I, Despres JP. The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects. *Diabetes Metab.* 1999;25(3):199-211.
73. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet.* 2005;366(9493):1267-78.
74. Brewer HB, Jr. Increasing HDL Cholesterol Levels. *N Engl J Med.* 2004;350(15):1491-4.
75. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2003;348(5):383-93.
76. Scheuner MT. Genetic evaluation for coronary artery disease. *Genet Med* 2003;5(4):269-85.
77. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation.* 2004;110(13):1868-73.
78. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part II: clinical implications. *Circulation.* 2004;110(14):2066-71.
79. Graham IM. The importance of total cardiovascular risk assessment in clinical practice. *Eur J Gen Pract.* 2006;12(4):148-55.
80. Güleç S. Kalp damar hastalıklarında global risk ve hedefler. *Türk Kardiyol Dern Arş.* 2009;37(Suppl. 2):1-10.
81. Tavlı T, Pekel N. Koroner Arter Hastalığında Risk Faktörleri. *Türkiye Klinikleri J Cardiol-Special Topics.* 2011;4(2):16-20.
82. ElBardissi AW, Aranki SF, Sheng S. Trends in isolated coronary artery bypass grafting: An analysis of the Society of Thoracic Surgeons adult cardiac surgery database. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012; 143: 273-81.
83. Elizondo Omaña RE, García Rodríguez M de los Ángeles, Morales Gómez JA. Vascular conduits used in the operation of myocardial revascularization *Med Univer* 2005; 7: 222-5.

84. Hinojosa-Amaya JM, Villarreal-Silva EE, Elizondo- Omaña RE. Conduits for myocardial revascularization grafts: The importance of morphology and imaging. *Med Univ* 2010; 12: 115-9.
85. Hoye A., van Domburg R.T. Sonnenschein K, Serruys P.W. Percutaneous coronary intervention for chronic total occlusions: the Thoraxcenter experience 1992-2002. *Eur Heart J*. 2005;26:2630–2636.
86. Kırallı K, Saçlı H. Coronary Artery Bypass Surgery, Coronary Artery Disease Assessment, Surgery, Prevention, Chapter 6, p.150-161, <http://www.intechopen.com/books/coronary-artery-diseaseassessment-surgery-prevention>. Erişim Tarihi: 17 Ocak 2018.
87. Di Bartolomeo R., Savini C. Coronary artery bypass grafting remains the gold standard for left main coronary disease, *G Ital Cardiol (Rome)*. 2009 Feb;10(2):108-12.
88. Yusuf S, Zucker D, Peduzzi P, Fisher L, Takaro T, Kennedy J, Davis K, Killip T, Passamani E, Norris R. Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: Overview of 10-year results from randomised trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialists Collaboration. *Lancet* 1994;344:563-570.
89. Diodato M, Chedrawy EG. Coronary artery bypass graft surgery: the past, present, and future of myocardial revascularisation. *Surg Res Pract* 2014; 2014: 6.
90. Hillis LD, Smith PK, Anderson JL. Special articles: 2011 ACCF/AHA guideline for coronary artery bypass graft surgery: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Anesth Analg*. 2012; 114: 11-45.
91. Hinojosa Amaya JM, Villarreal-Silva EE, Elizondo- Omaña RE, . Conduits for myocardial revascularization grafts: The importance of morphology and imaging. *Med Univ* 2010; 12: 115-9.
92. Gou-Wei H. Considerations in the choice of arterial grafts. In: Gou-Wei H, editor. *Arterial grafting for coronary artery bypass surgery*. 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006; p 81–6.
93. Mohr FW, Morice MC, Kappetein AP, . Coronary artery bypass graft surgery versus percutaneous coronary intervention in patients with three-vessel disease and left main coronary disease: 5-year follow-up of the randomised, clinical SYNTAX trial. *Lancet* 2013; 381: 629-38.

94. He GW. Arterial grafts for coronary artery bypass grafting: biological characteristics, functional classification, and clinical choice. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 277-84.
95. Yasir Abu-Omar, David P Taggart, Coronary artery bypass surgery, Revascularization, medicine journal, August 2010. Volume 38, Issue 8, Pages 446–449.
96. Gravlee GP, Davis RF, Kurusz M, Utley JR, editors. Historical Development of Cardiopulmonary Bypass: Cardiopulmonary Bypass Principles and Practice. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 5.
97. <http://www.flspinalcord.us/layers-of-the-pericardium/layers-of-the-pericardium-heart-anatomy-size-location-coverings-and-layers-anatomy/#s> Erişim tarihi: 24 Aralık 2017.
98. Gabella G. The pericardium. In: Standring S, ed. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 39th ed. St. Louis: Elsevier; 2005. p.995-6.
99. D'Avila, A. Pericardial anatomy for the interventional electrophysiologists. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2003;14, 422–430.
100. LeWinter MM, Myhre EESP, Slinker BK: Influence of the pericardium and ventricular interaction on diastolic function. In: Gaasch WH, LeWinter MM. *Heart Failure and Left Ventricular Diastolic Function*, Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p.103-17.
101. LeWinter MM. Pericardial Diseases. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier, Saunders; 2007. p.1829-52.
102. <http://www.dicle.edu.tr/Contents/8be02ace-9032-45a8-8c90-29e03eb440a1.pdf>. Erişim Tarihi: 21 Aralık 2017.
103. Polat Canbolat İ, Başkurt M, Perikardın Yapısı, Fonksiyonları ve Hastalık Halindeki Değişimleri. *Türkiye Klinikleri J Cardiol-Special Topics*. 2015;8(4).
104. <http://humananatomylibrary.com/anatomy-of-pericardium/anatomy-of-pericardium-layers-of-the-heart-muscle-pericardium-wikipedia-human-anatomy/> Erişim Tarihi: 24 Aralık 2017.
105. Lee J. M, Boughner D. R. Tissue mechanics of canine pericardium in differenttest environments. Evidence for time-dependent accommodation, absence of plasticity, and new roles for collagen and elastin. *Circ. Res.* 1981;49,533–544.

106. Lee J. M, Boughner, D. R. Mechanical properties of human pericardium. Differences in viscoelastic response when compared with canine pericardium. *Circ. Res.* 1985; 57, 475–481.
107. Gibbons Kroeker C. A, Shrive N. G, Belenkie I, Tyberg J. V. Pericardium modulates left and right ventricular stroke volumes to compensate for sudden changes in atrial volume. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;284, 2247–2254.
108. Lorenz C. H, Pastorek J. S, Bundy J. M. Delineation of normal human left ventricular twist throughout systole by tagged cine magnetic resonance imaging. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 2000; 2, 97–108.
109. Jöbsis P. D, Ashikaga H, Wen H, Rothstein E. C, Horvath K. A, McVeigh, E. R. The visceral pericardium: macromolecular structure and contribution to passive mechanical properties of the left ventricle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007;293, 3379–3387.
110. Randall W. C, Ardell J. L. Selective parasympathectomy of autonomic and conductile tissues of the canine heart. *Am. J. Physiol.* 1985; 248, 61–68.
111. Chiou C.W, Eble J.N, Zipes D.P. Efferent vagal innervation of the canine atria and sinus and atrioventricular nodes. The third fatpad. *Circulation.* 1997;95,2573–2584.
112. Yakut N, Kıralı K, Dağlar B. Konjenital Komplet Perikardiyal Agenezis. *Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 1999; 7:339-340.
113. Vesely T. M, Cahill D. R. Cross-sectional anatomy of the pericardial sinuses, recesses and adjacent structures. *Surg. Radiol. Anat.* 1986;8, 221–227.
114. Ben-Horin S, Shinfeld A, Kachel E, Chetrit A, Livneh A. The composition of normal pericardial fluid and its implications for diagnosing pericardial effusions. *The American journal of medicine.* 2005; 118 (6):636–40.
115. Chinchoy, E. *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology and Devices.* Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2005;101–110.
116. Mauer F. W, Warren M. F, Drinker, C. K. The composition of mammalian pericardial and peritoneal fluids. *Am. J. Physiol.* 1940; 129, 635–644.
117. Holt, J. P. The normal pericardium. *Am. J. Cardiol.* 1970; 26, 455–465.
118. Gibson A. T, Segal M. B. A study of the composition of pericardial fluid, with special reference to the probable mechanism of fluid formation. *J. Physiol.* 1978a; 277, 367–377.

119. Benhaïem-Sigaux N, Mina E, Sigaux F, Lambre C. R, Valensi F, Allegret C, Characterization of human pericardial macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 1985; 38, 709–721.
120. Vogiatzidis K, G. Zarogiannis S, Aidonidis I, I. Solenov E, Adam Molyvdas P, I. Gourgoulïanis K, Hatzoglou C. Physiology of pericardial fluid production and drainage. *Frontiers in Physiology*|www.frontiersin.org. 2015.00062, March2015|Volume6|Article62.
121. Baue AE, Blakemore WS. The pericardium. *The Annals of thoracic surgery.* 1972; 14(1):81–106.
122. Leo Rubin, Hudson P. Epicardial versus parietal pericardial defibrillation, *The American Journal of Emergency Medicine*, Volume 3, Issue 2, March 1985, P: 160-164.
123. Ömeroğlu SN, Ömeroğlu A, Ardal H. Epicardial Mesothelial Cyst Located Over Left Anterior Descending Artery, *Texas Heart Institute Journal.* 2004; 31:313-315.
124. Cinca J, Rodriguez-Sinovas A. Cardiovascular reflex responses induced by epicardial chemoreceptor stimulation. *Cardiovasc. Res.* 2000;45,163–171.
125. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Professional Edition. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2009. p. 581-3.
126. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol.* 1986; 57(6):450–8.
127. Horkay F, Laine M, Szokodi I, Leppaluoto J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Human pericardial fluid contains the highest amount of endothelin-1 of all mammalian biologic fluids thus far tested. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 1995; 26 Suppl 3:S502–4.
128. Fazekas L, Horkay F, Kekesi V, Huszar E, Barat E, Fazekas R. Enhanced accumulation of pericardial fluid adenosine and inosine in patients with coronary artery disease. *Life Sci.* 1999; 65 (10):1005–12.
129. Gomes RA, Teodoro LG, Lopes IC, Bersanetti PA, Carmona AK, Hial V. Angiotensin-converting enzyme in pericardial fluid: comparative study with serum activity. *Arq Bras Cardiol.* 2008; 91(3):156– 61, 72–8.
130. Hutchin P, Nino HV, Suberman R. Electrolyte and acid-base composition of pericardial fluid in man. *Archives of surgery.* 1971; 102(1):28–30.
131. Gibson A. T, Segal M. B. A study of the routes by which protein passes from the pericardial cavity to the blood in rabbits. *J. Physiol.* 1978b; 280, 423–433.

132. Spodick DH. Physiology of the normal pericardium: Functions of the pericardium. The pericardium. A Comprehensive Textbook. New York. Marcel Decker. 1997.p.15-26.
133. Stewart R. H, Rohn A. Allen S. J, and Laine G. A. Basic determinants of epicardial transudation. *Am. J. Physiol.* 1997;273, 1408–1414.
134. Yuan Z, Boulanger B, Flessner M, Johnston M. Relationship between pericardial pressure and lymphatic pericardial fluid transport in sheep. *Microvasc. Res.* 2000;60, 28–36.
135. Shabetai R. The Pericardium (Developments in Cardiovascular Medicine), Boston, MA: Kluwer Academic Publishers. Simionescu D, Simionescu A, Deac R. (1993). Mapping of glutaraldehyde- treated bovine pericardium and tissue selection for bioprosthetic heart valves. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003;27, 697–704.
136. Miyazaki T, Pride HP, Zipes DP. Prostaglandins in the pericardial fluid modulate neural regulation of cardiac electrophysiological properties. *Circ Res* 1990;66(1):163-75.
137. Kabbani SS, Le Winter M. Pericardial disease. Crawford MH, Di MarcoJP. *Cardiology*. London: Mosby International; 2001. p.5.15.1-8.
138. Pankuweit S, Ristić AD, Seferović PM, Maisch B. Bacterial pericarditis: diagnosis and management. *Am J Cardiovasc Drugs* 2005;5(2): 103-12.
139. Spodick DH: Pericardial diseases. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. *Heart Disease*. Philadelphia, WB Saunders, 2001. p.1838-48.
140. Horkay F, Szokodi I, Selmei L, Merkely B, Kekesi V, Vecsey T. Presence of immunoreactive endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in human pericardial fluid. *Life sciences.* 1998; 62(3):267–74.
141. Namiki A, Kubota T, Fukazawa M, Ishikawa M, Moroi M, Aikawa J. Endothelin-1 concentrations in pericardial fluid are more elevated in patients with ischemic heart disease than in patients with nonischemic heart disease. *Japanese heart journal.* 2003; 44(5):633–44.
142. Shah AM, MacCarthy PA. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Ther.* 2000; 86(1):49–86.
143. *Türk Kardiyol Dern Arş* 2004; 32: 581-590)3,36.
144. Landau C1, Jacobs AK, Haudenschild CC. Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *Am Heart J.* 1995 May;129(5):924-31.

145. Shabetai R. The effects of pericardial effusion on respiratory variations in hemodynamic and ventricular function. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17:249-250.
146. Malouf JF, Alam S, Gharzeddine W, Stefadouros MA. The role of anticoagulation in the development of pericardial effusion and late tamponade after cardiac surgery. *Eur Heart J* 1993; 14:1451-1457.
147. Adler Y, Finkelstein Y, Guindo J. Colchicine treatment for recurrent pericarditis: A decade of experience. *Circulation* 1998; 97(21):2183-2185.
148. Okum EA, DeAnda A, Jr. Pericardial disease. In: Yuh DD, Vricella LA, Baumgartner WA. *The Johns Hopkins Manual of Cardiothoracic Surgery*. Baltimore: The McGraw-Hill Companies, Inc, 2007:1049-1056.
149. Spodick D. Macrophysiology, microphysiology, and anatomy of the pericardium: A synopsis. *Am Heart J* 1992; 124:1046-1051.
150. Ziskind AA, Palacios IF. Percutaneous balloon pericardiotomy for patients with pericardial effusion and tamponade. In Topol EJ (ed). *Textbook of Interventional Cardiology*, 3rd ed., New York: Saunders, 1999: 869-877.
151. Spodick DH. Acute cardiac tamponade. *N Engl J Med* 2003;349:684-90.
152. Troughton RW, Asher CR, Klein AL. Pericarditis. *Lancet* 2004; 363:717-27.
153. Fujita M, Komeda M, Hasegawa K, Kihara Y, Nohara R, Sasayama S. Pericardial fluid as a new material for clinical heart research. *Int J Cardiol* 2001; 77:113-8.
154. Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS. The relationship between nonprotein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays* 2007; 29:288–99.
155. Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res*. 2011;90:430-40.
156. Ke XS, Liu CM, Liu DP, Liang CC. MicroRNAs: key participants in gene regulatory networks. *Curr Opin Chem Biol*. 2003;4:516-23.
157. Thum T, Galuppo P, Wolf C. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007;3:258-67.
158. 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(5): 843-54.
159. Van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heartdisease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest*. 2007;117:2369–2376.
160. <http://www.exiqon.com/what-are-microRNAs>. Erişim tarihi: 01 Mayıs 2017

161. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. Mikro RNA'lar ve kanser. Dicle Medical Journal 2011; 38(1):113-20.
162. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. Cancer Sci 2010; 101(11): 2309-15.
163. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J.2004; 23:4051-60.
164. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat Struct Mol Biol.2006;13:1097-101.
165. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and function. Tromb Haemotology.2012;107:605-10.
166. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, . The nuclear RNase III Drosha initiates mikroRNA processing. Nature 2003; 425 (6956):415-9.
167. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. (2004). Nature 432(7014):231.
168. http://www.genetimes.hk/gmall/index.php?route=product/category&path=60_70
Erişim Tarihi: 22 Şubat 2018
169. Ramiro G, George A. Calin, Carlo M. Croce. MicroRNAs in Cancer, Annual Review of Medicine 2009;60:167-179.
170. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet. 2004;5:522-31.
171. Curtis HJ, Sibley CR, Wood MJA. Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2012; 3:617-32.
172. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. Int.J.Cancer 2008; 122:969- 977.
173. Takaya S, Pal S, MicroRNAs-targeting and target prediction. New Biotechnology 2010; 3:243–249.
174. <https://www.nature.com/articles/nrm3838> Erişim Tarihi:22 Şubat 2018.
175. Ladewig E, Okamura K, Flynt AS, Westholm JO, Lai EC. Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. Genome Res.2012;22:1634-45.
176. Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. Biochimie. 2011;93:1897- 904.
177. Güzelgül F, Aksoy K, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. Archives Medical Review Journal 2015;24(4):472-493.

178. Fiorucci G, Chiantore MV, Mangino G, Percario ZA, Affabris E, Romeo G. Cancer regulator microRNA: potential relevance in diagnosis, prognosis and treatment of cancer. *Curr Med Chem*. 2012;19:461-74.
179. Lässer C, O'Neil SE, Ekerljung L, Ekström K, Sjöstrand M, Lötval J. RNA-containing exosomes in human nasal secretions. *Am J Rhinol Allergy*. 2011;25:89-93.
180. Klimczak D, Pączek L, Jażdżewski K, Kuch M. MicroRNAs: powerful regulators and potential diagnostic tools in cardiovascular disease. *Kardiologia Polska*; 2015;73, 1: 1–6.
181. <http://circres.ahajournals.org/content/108/2/219.figures-only>. Erişim Tarihi: 22 Şubat 2018.
182. Rottlan N, Hernando CF. MicroRNA regulation of cholesterol metabolism. *Cholesterol*. 2012;2012:1-8.
183. Krützfeldt J, Stoffel M. MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab*. 2006;4:9-12.
184. Poy MN, Spranger M, Stoffel M. MicroRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes Obes Metab*. 2007;9:67-73.
185. Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:239-50.
186. Tunalı NE, Tiryakioğlu NO. Kanserde mikroRNA'ların rolü. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2010; 30:1690-700.
187. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 2006;9:435-43
188. Van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics. *Circ Res*. 2012;110:496-507.
189. Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. *Gene Therapy*. 2011; 18:1104-10.
190. Huang S, Chen M, Li L, He M, Hu D, Zhang X. Circulating MicroRNAs and the Occurrence of Acute Myocardial Infarction in Chinese Populations. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014; 7: 189–98.
191. Gidlöf O, van der Brug M, Ohman J, Gilje P, Olde B, Wahlestedt C. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood*. 2013; 121: 3908–17, S1–26.

192. Lv P, Zhou M, He J, Meng W, Ma X, Dong S. Circulating miR-208b and miR-34a are associated with left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Int J Mol Sci*. 2014; 15: 5774–88.
193. Li Z, Lu J, Luo Y, Li S, Chen M. High association between human circulating microRNA-497 and acute myocardial infarction. *ScientificWorldJournal*. 2014; 2014: 931845.
194. Shan Z, Yao C, Li Z, Teng Y, Li W, Wang J, . Differentially expressed microRNAs at different stages of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Chin Med J (Engl)*. 2013; 126: 515–20.
195. Bidzhekov K, Gan L, Denecke B, Rostalsky A, Hristov M, Koeppel TA. microRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans. *Thromb Haemost*. 2012; 107: 619–25.
196. Emanueli C, Thum T. miRNome-34 induces cardiac damage. *Cell Res*. 2013; 23: 866–7.
197. Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, . MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature*. 2013; 495: 107–10.
198. Melman YF, Shah R, Das S. MicroRNAs in heart failure: is the picture becoming less miRky. *Circ Heart Fail*. 2014; 7: 203–14.
199. Goren Y, Kushnir M, Zafir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2012; 14: 147–54.
200. http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/view_gene.cgi?rs=ENST00000311734.2&taxid=9606&members=&showcnc=0&shownc=0&showncf1=&showncf2=&subset=1. Erişim tarihi: 30 Aralık 2017.
201. http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php?opt=disease_intermediate_mirna&disease_mirna=coronary+artery+disease&disease=. Erişim tarihi: 30 Aralık 2017.
202. Janika V, Claudia B, Ariana F, Thomas T. Regulatory RNAs and paracrine networks in the heart, European Society of Cardiology, Cardiovascular Research, 2014;102, 290–301.
203. Demyanets S, Kaun C, Pentz R, Krychtiuk KA, Rauscher S, Pfaffenberger S. Components of the interleukin-33/ST2 system are differentially expressed and regulated in human cardiac cells and in cells of the cardiac vasculature. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;60:16–26.

204. Weinberg EO, Shimp M, De Keulenaer GW, Mac Gillivray C, Tominaga S, Solomon SD. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106:2961.
205. Zhu J, Carver W. Effects of interleukin-33 on cardiac fibroblast gene expression and activity. *Cytokine*. 2012;58:368–379.
206. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9173?report=gene_table. Erişim Tarihi. 10.05.2018.
207. Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett* 1989;258:301–4.
208. Werenskiold AK, Hoffmann S, Klemenz R. Induction of a mitogen-responsive gene after expression of the Ha-ras oncogene in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989; 9:5207–14.
209. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E. IL33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23: 479–490.
210. Dieplinger B, Mueller T. Soluble ST2 in heart failure. *Clinica Chimica Acta*. 2015; 443, 57–70.
211. Baba Y, Maeda K, Yashiro T, Inage E, Kasakura K, Suzuki R, Niyonsaba F, Hara M, Tanabe A, Ogawa H, Okumura K, Ohtsuka Y, Shimizu T, Nishiyama C. GATA2 is a critical transactivator for the human IL1RL1/ST2 promoter in mast cells/basophils: opposing roles for GATA2 and GATA1 in human IL1RL1/ST2 gene expression. *J Biol Chem*. 2012;287:32689e32696.
212. Caporali A, Meloni M, Miller AM, Vierlinger K, Cardinali A, Spinetti G, Nailor A, Faglia E, Losa S, Gotti A, Fortunato O, Mitic T, Hofner M, Noehammer C, Madeddu P, Emanuelli C. Soluble ST2 is regulated by p75 neurotrophin receptor and predicts mortality in diabetic patients with critical limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:e149ee160.
213. Ho JE, Chen W-Y, Chen M-H, Larson MG, McCabe EL, Cheng S, Ghorbani A, Coglianese E, Emilsson V, Johnson AD, Walter S, Franceschini N, O'Donnell CJ, Dehghan A, Lu C, Levy D, Newton-Cheh C, Lin H, Felix JF, Schreiter ER, Vasan RS, Januzzi JL, Lee RT, Wang TJ, Assimes TL, Deloukas P, Erdmann J, Holm H, Kathiresan S, König IR, McPherson R, Reilly MP, Roberts R, Samani NJ, Schunkert H,

- Stewart AFR. Common genetic variation at the IL1RL1 locus regulates IL33/ST2 signaling. *J Clin Invest*. 2013;123:4208e4218.
214. Weinberg EO. ST2 protein in heart disease: From discovery to mechanisms and prognostic value. *Biomark Med*. 2009; 3:495–511.
215. Liu X, Hammel M, He Y, Tainer JA, Jeng US, Zhang L. Structural insights into the interaction of IL33 with its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:14918–23.
216. Seki K, Sanada S, Kudinova AY. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail*. 2009;2:684–91.
217. Shimpo M, Morrow DA, Weinberg EO. Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109:2186–90.
218. Januzzi Jr JL, Peacock WF, Maisel AS. Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea: results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:607–13.
219. Wang TJ, Wollert KC, Larson MG. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2012;126:1596–604.
220. Kakkar R, Hei H, Dobner S, Lee R.T. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J. Biol. Chem*. 2012; 287, 6941–6948.
221. Kakkar R, Hei H, Dobner S, Lee R.T. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J. Biol. Chem*. 2012; 287, 6941–6948.
222. Matteo Ciccone M, Cortese F, Gesualdo M, Riccardi R, Di Nunzio D, Moncelli M, Iacoviello M and Scicchitano P. A Novel Cardiac Bio-Marker: ST2: *Molecules* 2013;18, 15314-15328.
223. Truong QA, Januzzi JL, Szymonifka J. Coronary sinus biomarker sampling compared to peripheral venous blood for predicting outcomes in patients with severe heart failure undergoing cardiac resynchronization therapy: the BIOCRT Study. *Heart Rhythm*. 2014.07.007.
224. Bartunek J, Delrue L, Van Durme F. Nonmyocardial production of ST2 protein in human hypertrophy and failure is related to diastolic load. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:2166–74.

225. Manzano-Fernández S, Mueller T, Pascual-Figal D, Truong Q.A, Januzzi J.L. Usefulness of soluble concentrations of interleukin family member st2 as predictor of mortality in patients with acutely decompensated heart failure relative to left ventricular ejection fraction. *Am. J. Cardiol.* 2011, 107, 259–267.
226. Ky B, French B, Levy W.C, Sweitzer N.K, Fang J.C, Wu A.H, Goldberg L.R, Jessup M, Cappola T.P, Multiple biomarkers for risk prediction in chronic heart failure. *Circ. Heart Fail.* 2012;5, 183–190.
227. Chen L.Q, de Lemos J.A, Das S.R, Ayers C.R, Rohatgi A. Soluble ST2 is associated with all-cause and cardiovascular mortality in a population-based cohort: The Dallas Heart Study. *Clin. Chem.* 2013; 59, 536–546.
228. Kuroiwa K, Li H, Tago K. Construction of ELISA system to quantify human ST2 protein in sera of patients. *Hybridoma.* 2000;19:151–9.
229. Coglianese EE, Larson MG, Vasan RS, . Distribution and clinical correlates of the interleukin receptor family member soluble ST2 in the Framingham Heart Study. *Clin Chem* 2012;58:1673–81.
230. Dieplinger B, Egger M, Poelz W, Gabriel C, Haltmayer M, Mueller T. Soluble ST2 is not independently associated with androgen and estrogen status in healthy males and females. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49:1515–8.
231. Dieplinger B, Mueller T. *Clinica Chimica Acta* 443. 2015;57–70. P.60.
232. James L, Januzzi Jr, ST2 as a Cardiovascular Risk Biomarker: From the Bench to the Bedside. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2013; 6:493–500.
233. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD. ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur Heart J* 2012;33:1787–847.
234. Demyanets S, SpeidlWS, Tentzeris I. Soluble ST2 and interleukin-33 levels in coronary artery disease: relation to disease activity and adverse outcome. *PLoS One* 2014;9:e95055.
235. Weir RA, Miller AM, Murphy GE. Serum soluble ST2: a potential novel mediator in left ventricular and infarct remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:243–50.
236. Brown AM, Wu AH, Clopton P, Robey JL, Hollander JE. ST2 in emergency department chest pain patients with potential acute coronary syndromes. *Ann Emerg Med.* 2007;50:153–8.

237. Aldous SJ, Richards AM, Troughton R, Than M. ST2 has diagnostic and prognostic utility for all-cause mortality and heart failure in patients presenting to the emergency department with chest pain. *J Card Fail.* 2012;18:304–10.
238. Dieplinger B, Egger M, Haltmayer M. Increased soluble ST2 predicts long-term mortality in patients with stable coronary artery disease results from the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin Chem.* 2014;60: 530–40.
239. Dieplinger B, Januzzi Jr JL, Steinmair M, . Analytical and clinical evaluation of a novel high-sensitivity assay for measurement of soluble ST2 in human plasma the Presage ST2 assay. *Clin Chim Acta.* 2009;409:33–40.
240. Dieplinger B, Egger M, Poelz W, Haltmayer M, Mueller T. Long-term stability of soluble ST2 in frozen plasma samples. *Clin Biochem.* 2010;43:1169–70.
241. Lu J, Snider JV, Grenache DG. Establishment of reference intervals for soluble ST2 from a United States population. *Clin Chim Acta* 2010;411:1825–6.
242. Kanda M, Ohto-Ozaki H, Kuroiwa K, Tominaga S, Watanabe E, Iwahana H. Elevation of ST2 protein levels in cerebrospinal fluid following subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol Scand.* 2006;113:327–333.
243. Brunner M, Krenn C, Roth G, Moser B, Dworschak M, Jensen-Jarolim E. Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. *Intensive Care Med.* 2004;30:1468–1473.
244. Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299:18–24.
245. Becerra A, Warke RV, de BN, Rothman AL, Bosch I. Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients. *Cytokine* 2008;41:114–120.
246. Mildner M, Storka A, Lichtenauer M, Mlitz V, Ghannadan M, Hoetzenecker K, Nickl S, Dome B, Tschachler E, Jan Ankersmit H. Primary sources and immunological prerequisites for sST2 secretion in humans. *European Society of Cardiology Cardiovascular Research.* 2010; 87, 769–777.
247. Shao D, Perros F, Humbert M. Is there a role for IL33 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Thorax.* 2010;65:A70.
248. Mahmood A, McSharry C, Xu D. The role of ST2 in a model of pulmonary hypertension. *Thorax.* 2010;65:A70–A71.

249. Carlomagno G, Messalli G, Melillo RM. Serum soluble ST2 and interleukin-33 levels in patients with pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol.* 2013;168:1545–1547.
250. Shah RV, Chen-Tournoux AA, Picard MH. Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acute dyspnea. *Circ Heart Fail.* 2009;2:311–319.
251. Agoston-Coldea L, Lupu S, Hicea S. Serum levels of the soluble IL-1 receptor family member ST2 and right ventricular dysfunction. *Biomark Med.* 2014;8:11–18.
252. Guo Zheng Y, Yang T, Guo He J, Chen G, Hong Liu Z, Ming Xiong C, Gu Q, Hai Ni X, Hui Zhao Z. Plasma Soluble ST2 Levels Correlate With Disease Severity and Predict Clinical Worsening in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Clin. Cardiol.* 2014. 37, 6, 365–370.
253. Bandara G, Michael A. Beaven, Olivera A, M. Gilfillan A, D. Metcalfe D. Activated Mast Cells Produce Soluble ST2, a Decoy Receptor for IL33, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* Volume 135 Issue 2 (Suppl). Page AB64. 2014.12.1143.
254. E. Pfeffer P, Huai Chen Y, Woszczek G, C. Matthews N, Chevretton E, FRCS, Gupta A, Saglani S, Bush A, Corrigan C, J. Cousins D, M. Hawrylowicz C. Vitamin D enhances production of soluble ST2, inhibiting the action of IL33. *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 135(3): 824–827.e3.
255. Watanabe M, Nakamoto K, Sada M, Inui T, Takata S, Yokoyama T, Saraya T, Ishii H, Takizawa H. Bacterial and Viral Infection Enhances sST2 Production by Bronchial Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2017;195:A5200.
256. Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spina L, Mattioli B, Scarpa M, Fiocchi C, Vecchi M, Pizarro TT. Epithelial-derived IL33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107:8017–8022.
257. Diaz-Jimenez D, Nunez LE, Beltran CJ, Candia E, Suazo C, Alvarez-Lobos M, Gonzalez MJ, Hermoso MA, Quera R. Soluble ST2: a new and promising activity marker in ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology: WJG.* 2011;17:2181–2190.

258. Szerafin T, Brunner M, Horváth A, Szentgyörgyi L, Moser B, Boltz-Nitulescu G. Soluble ST2 protein in cardiac surgery: a possible negative feedback loop to prevent uncontrolled inflammatory reactions. *Clin Lab*. 2005;51:657–663.
259. Szerafin T, Niederpold T, Mangold A, Hoetzenecker K, Hacker S, Roth G. Secretion of soluble ST2 possible explanation for systemic immunosuppression after heart surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;57:25–29.
260. Wang X, Huang W, Liu G, Cai W, Millard RW, Wang Y, Chang J, Peng T, Fan GC. Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 74: 139–150
261. Ren X.P, Wu J, Wang X, Sartor M.A, Qian J, Jones K, Nicolaou P, Pritchard T.J, Fan G.C. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation*. 2009, 119, 2357–2366.
262. Vegter EL, Schmitter D, Hagemeijer Y, Ovchinnikova ES, van der Harst P, Teerlink JR, O'Connor CM, Metra M, Davison BA, Bloomfield D8, Cotter G, Cleland JG, Givertz MM, Ponikowski P, van Veldhuisen DJ, van der Meer P, Berezikov E, Voors AA, Khan MA. Use of biomarkers to establish potential role and function of circulating microRNAs in acute heart failure. *International Journal of Cardiology* 224 2016;231–239.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1979 yılında Şanlıurfa'da doğdum. İlkokul eğitimimin ilk 4 yılını Gaziantep'te, ilkokul 5. Sınıf, ortaokul ve lise eğitimimi Şanlıurfa'da tamamladım. 1998 yılında Çukurova Üniversitesi SHMYO Tıbbi Laboratuvar programından mezun oldum. 2004 yılında Harran Üniversitesinde Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji lisansımı, 2007 yılında Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Perfüzyon yüksek lisansımı tamamladım. 2018 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji-Genetik doktora programından mezun oldum. Halen Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Perfüzyon doktora programına devam etmekteyim. 2000-2002 yılları arasında Dicle üniversitesi Tıp Fakültesinde Sağlık Teknikeri olarak çalışmaya başladım. 2002-2004 yılları arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Sağlık Teknikeri olarak çalışmaya devam ettikten sonra 2004-2011 yılları arasında aynı hastanede biyolog olarak çalıştım. 2011 yılından bu yana Harran Üniversitesinde öğretim görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim. Evli ve 2 kız çocuk babasıyım.