

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MİKRORNA VE İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ
İLE APELİN, ENDOKAN, KİNURENİN PROTEİN DÜZEYİNDEKİ
DEĞİŞİMLERİN PULMONER ARTERİYEL HİPERTANSİYON
ETYOPATOGENEZİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ALPEREN EMRE AKGÜN

DANIŞMAN

DOÇ. DR. YALIN TOLGA YAYLALI

DENİZLİ - 2020

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MİKRORNA VE İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ
İLE APELİN, ENDOKAN, KİNURENİN PROTEİN DÜZEYİNDEKİ
DEĞİŞİMLERİN PULMONER ARTERİYEL HİPERTANSİYON
ETYOPATOGENEZİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. ALPEREN EMRE AKGÜN

DANIŞMAN

DOÇ. DR. YALIN TOLGA YAYLALI

DENİZLİ - 2020

ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

Kardiyoloji uzmanlık eğitimim süresinde bilgi ve deneyimlerini aktarması, tez sürecinde her konuda önümü açan, kolaylaştıran değerli hocam tez danışmanım Doç. Dr. Yalın Tolga Yaylalı'ya,

Kardiyoloji uzmanlık eğitim sürecime olan katkılarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Havane Asuman Kaftan Tellioglu'na, Prof. Dr. Dursun Dursunoğlu'na, Prof. Dr. Halil Tanrıverdi'ye, Doç. Dr. İsmail Doğu Kılıç'a, Doç. Dr. Gökay Nar'a, Doç. Dr. Samet Yılmaz'a, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Koray Adalı'ya, Yrd. Doç. Dr. İpek Büber'e

Tezimin her aşamasında desteklerini hissettiğim Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi değerli hocam Doç. Dr. Yavuz Dodurga'ya ve Arş. Gör. Dr. Mücahit Seçme'ye

Tezimin istatistik kısmında desteği bulunan Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Dr. Hande Şenol'a,

Asistanlığım boyunca birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma

Bugünlere gelmemde bana maddi manevi her konuda destek veren sevgili babam Süleyman Akgün'e, sevgili annem Hatice Akgün'e, ablalarım Aslıhan Banu Er ve Kadriye İrem Akgün'e ve Eniştem Okan Er'e

Evlilikle başlayan hayat arkadaşlığında her zaman dostum, arkadaşım, yardımcım olan sevgili eşim Habibe Radiye Akgün'e

Hayatımıza girmeleriyle beraber mutluluk kaynaklarımız olan kıymetli evlatlarımız Şifa Sıdika Akgün ve Alameddin Fatih Akgün'e

Bu süreçte her zaman dualarını ve desteklerini eksik etmeyen sevgili büyüklerim, tüm hocalarım ve mesai arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Alperen Emre Akgün

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY SAYFASI...	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER – KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
ÖZET	XI
İNGİLİZCE ÖZET.....	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pulmoner Hipertansiyon	
2.1.1. Tanım	
2.1.2. Epidemiyolojisi	
2.1.3. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon Tanım	
2.1.4. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon da Patoloji	
2.1.5. Klinik Bulgular	
2.1.6. Genetik	
2.2. Pulmoner Hipertansiyonda Ekokardiyografi	
2.2.1. İki Boyutlu Ekokardiyografi	
2.2.2. M-Mod Ekokardiyografi	
2.2.3. Konvansiyonel Doppler Görüntüleme	
2.2.4. Doku Doppler Görüntüleme	
2.2.5. Üç Boyutlu Ekokardiyografi	
2.3. Pulmoner Hipertansiyonda Elektrokardiyografi	

2.4. Toraks Grafisi	
2.5. Solunum Fonksiyon Testleri	
2.6. Ventilasyon/Perfüzyon Akciğer Sintigrafisi	
2.7. Yüksek Çözünürlüklü Bilgisayarlı Tomografi, Kontrastlı Bilgisayarlı Tomografi ve Pulmoner Anjiyografi	
2.8. Sağ Kalp Kateterizasyonu ve Vazoreaktivite	
2.9. Natriüretik peptitler	
2.10. MikroRNA mekanizması ve Pulmoner hipertansiyondaki rolü	
2.11. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonda mikroRNA ile ilişkili genler	
2.12. Apelin, Kinürenin, Endokan	
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	23
4. BULGULAR	33
4.1. Hasta ve Kontrol gruplarının demografik verileri	
4.2. Hasta ve Kontrol gruplarından RT-PCR ile mikroRNA ve genetik parametrelerin düzeyleri	
4.3. Hasta ve Kontrol gruplarının serumlarından Elisa ile Apelin, Endokan, Kinürenin bakılması	
4.4. Hasta ve Kontrol gruplarında bakılan parametrelerin birbirleri ile ilişkisi	
5. TARTIŞMA	42
6. ÇALIŞMANIN KISITLILIKLARI.....	52
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
8. KAYNAKLAR.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALK-1	: Aktivin 8 reseptörü benzeri kinaz tip 1
ANP	: Atriyal natriüretik peptid
ASD	: Atriyal septal defekt
APLN	: Apelin
BER	: Baz eksizyon onarımı
BMPR2	: Kemik morfojenetik protein reseptörü tip 2
BNP	: B-tipi natriüretik peptid
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CAV1	: Caveolin-1
cDNA	: Komplementer DNA
CW	: Devamlı dalga
EKG	: Elektrokardiyografi
ENG	: Endoglin
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR-1	: Fibroblast Büyüme Faktör reseptörü-1
HIF	: Hipoksi indüklenbilir faktör
HPAH	: Herediter PAH
İPAH	: İdiyopatik pulmoner hipertansiyon
IV	: İntravenöz
İVC	: İnferyor vena cava
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
KCNK3	: Potasyum kanalı süper ailesi K üye-3
KTEPH	: Kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon
MİRNA	: MikroRNA
MCT	: Monocrotaline
NO	: Nitrik oksit

NT-proBNP	: N terminal proBNP
OPAB	: Ortalama pulmoner arter basıncı
PARP-1	: Poli ADP riboz polimeraz-1
PAH	: Pulmoner arteriyel hipertansiyon
PAWP	: Pulmoner arter kama basıncı
PAZ	: Pulmoner akselerasyon zamanı
PH	: Pulmoner hipertansiyon
PPAR	: Peroksizom proliferatör-aktive edici reseptörü
PVR	: Pulmoner vaskuler direnç
PW	: Pulse dalga
RISC	: RNA uyarılmış susturma kompleksi
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SFT	: Solunum fonksiyon testleri
SĞAB	: Sağ atriyum basıncı
SĞVSB	: Sağ ventrikül sistolik basıncı
SĞVÇY	: Sağ ventrikül çıkış yolu
SKK	: Sağ kalp kateterizasyonu
STAT-3	: Transkripsiyonun sinyal iletici ve aktive edicisi 3
SPAB	: Sistolik pulmoner arter basıncı
TAPSE	: Triküspit anüler planda sistolik yer değiştirmesi
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü
TRP	: Triptofan
TRV	: Triküspit yetersizlik velositesi
TVI	: Zaman hız intervali
VSD	: Ventriküler septal defekt
WU	: Wood Ünit
YÇBT	: Yüksek çözünürlüklü BT

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO	SAYFA
Şekil 1. MikroRNA sentezi ve olgunlaşması	19
Şekil 2. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen Apelin absorbans ve konsantrasyonu.....	37
Şekil 3. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen Apelin konsantrasyonu.....	37
Şekil 4. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen Endokan absorbans ve konsantrasyonu.....	38
Şekil 5. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen Endokan konsantrasyonu.....	38
Şekil 6. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen Kinürenin absorbans ve konsantrasyonu....	39
Şekil 7. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen Kinürenin konsantrasyonu.....	40

TABLULAR DİZİNİ

TABLO NO	SAYFA
Tablo 1. Pulmoner hipertansiyon klinik sınıflandırması.....	4
Tablo 2. Pulmoner hipertansiyon hemodinamik sınıflandırma.....	5
Tablo 3. Ekokardiyografik inceleme ile Pulmoner hipertansiyon olasılığını değerlendirme.....	11
Tablo 4. Ekokardiyografik değerlendirmede diğer Pulmoner hipertansiyon düşündürülen bulgular.....	12
Tablo 5. PH ekokardiyografik olasılığına göre, PAH ya da KTEPH için, PH klinik bulguları olan, PH risk faktörü olan ya da olmayan hastalarda önerilen olası PH tanı yönetimi.....	13
Tablo 6. cDNA Sentez Karışımı.....	25
Tablo 7. miRNA cDNA sentez karışımı (abm).....	26
Tablo 8. Reaksiyon karışımı.....	26
Tablo 9. Çalışmamızda kullanılan genlerin forward ve reverse primer dizileri.....	27
Tablo 10. Hasta ve Kontrol gruplarının demografik verileri.....	33
Tablo 11. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen ortalama miRNA düzeyleri ve istatistiksel değerlendirmesi.....	34
Tablo 12. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen miRNA ekspresyon kat değişimi.....	35
Tablo 13. Hasta ve kontrol gruplarında <i>FGFR-1</i> , <i>FGF-2</i> , <i>HIF-1α</i> , <i>HIF-2α</i> , <i>PARP-1</i> , <i>STAT-3</i> ortalama düzeyleri ve istatistiksel analizi.....	36
Tablo 14. Ölçülen örneklerin birbiriyle regresyon analizi.....	41

ÖZET

MİKRORNA VE İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ İLE APELİN, ENDOKAN, KİNÜRENİN PROTEİN DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN PULMONER ARTERİYEL HİPERTANSİYON ETYOPATOGENEZİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

AMAÇ: Pulmoner hipertansiyonun (PH) patobiyolojik bulgularının anlaşılması hala tam bilinmemektedir. Biriken kanıtlar, mikroRNA'lardaki (miRNA) bozulmuş regülasyonun, PH'deki pulmoner vasküler hücrelerdeki hiperproliferatif ve apoptoza dirençli patofenotipleriyle bağlantılı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın amacı, mRNA ve miRNA ekspresyonundaki değişiklikler ile bunların sinyal yollarındaki rollerini belirlemek, seviyelerini PH şiddetiyle ilişkilendirmek ve bu değişiklikler ile apelin (APLN), kinürenin ve endokan'ın serum seviyeleri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

METOT: Çalışmaya yeni tanı daha önceden PH tedavisi almamış 54 hasta ile yaş ve cinsiyet uyumlu 55 sağlıklı kontrol grubu dahil edildi. Tüm hastalara sağ kalp kateterizasyonu uygulandı. Toplam RNA, TRIzol reaktifi kullanılarak izole edildi ve mRNA ve miRNA için komplementer DNA (cDNA)'lar, üreticinin kit protokollerine göre sentezlendi. Hipoksi ile indüklenebilir faktör (*HIF*) -1 alfa, *HIF-2 alfa*, transkripsiyonun sinyal iletici ve aktive edicisi 3 (*STAT-3*), fibroblast büyüme faktörü-2 (*FGF-2*), fibroblast büyüme faktörü reseptörü-1 (*FGFR-1*), Poli-ADP-riboz polimeraz 1 (*PARP-1*)'in mRNA ekspresyonları ve miRNA-130a, miRNA-204, miRNA-210, miRNA-223 ve miRNA-424'ün miRNA ifadeleri Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile belirlenmiştir. APLN, kinürenin ve endokan konsantrasyonları ELISA yöntemi ile analiz edildi.

BULGULAR: PH hastalarının plazmalarında *HIF-2 alfa* ve *STAT-3*'ün mRNA ekspresyonlarında artış ile miRNA-130a ve miRNA-210 ekspresyonlarında artış saptanırken; miRNA-204 ekspresyonunda ise azalma saptandı. PH hastalarının

serumlarında APLN ve kinürenin konsantrasyonlarında azalma izlendi. PH hastalarında APLN-miRNA-424 arasında pozitif korelasyon izlenirken ($r=0,309$, $p=0,024$) ; *FGFR-1*-miRNA-210: $r=(-)0,288$, $p=0,042$; *FGF-2*-miRNA-204: $r=(-)0,452$, $p=0,001$; *HIF-2 α* -miRNA-204: $r=(-)0,357$, $p=0,014$; *HIF-2 α* -miRNA-223: $r=(-)0,359$, $p=0,025$. aralarında negatif korelasyon izlendi.

SONUÇ: Çalışma bulgularımız miRNA-210, miRNA-130a, *HIF-2 α* ve *STAT-3* inhibisyonunu; APLN, kinürenine, miRNA-204 konsantrasyonlarını arttırmayı hedef alan yeni terapötik rejimlerin geliştirilmesi gerektiğini göstermiştir. Aynı zamanda PH hastalarında APLN-miRNA-424, *FGFR-1*-miRNA-210, *FGF-2*-miRNA-204, *HIF-2 α* -miRNA-204 ve *HIF-2 α* -miRNA-223 arasında daha önceden belirtilmeyen bir ilişki tespit ettik.

ABSTRACT

EFFECTS OF EXPRESSION LEVELS OF MICRORNA AND RELATED GENES AND APELIN, ENDOKAN AND KYNURENINE CONCENTRATION ON ETHIOPATOGENESIS OF PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION

BACKGROUND: Understanding of the pathobiologic manifestations of pulmonary hypertension (PH) is still unknown. Accumulating evidence suggests that dysregulation of microRNAs (miRNA) is linked to the hyperproliferative and apoptosis-resistant pathophenotypes of pulmonary vascular cells in PH. The aims of the present study were to determine the alterations in mRNA and miRNA expressions and their role in signaling pathways, to correlate their levels with the severity of PH, and to investigate the relationship between those alterations and serum levels of apelin (APLN), kynurenine, and endocan in PH.

METHODS: The study included 54 consecutive treatment-naïve patients with PH and 55 age and sex-matched healthy controls. All subjects underwent right heart catheterisation. Total RNA was isolated using TRIzol reagent and complementary DNAs (cDNA) for mRNA and miRNA were synthesized according to manufacturer's kit protocols. mRNA expressions of hypoxia inducible factor (*HIF*)-1 *alfa*, *HIF*-2 *alfa*, signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT*-3), fibroblast growth factor-2 (*FGF*-2), fibroblast growth factor receptor-1 (*FGFR*-1), Poly-ADP-ribose polymerase 1 (*PARP*-1) and miRNA expressions of miRNA-130a, miRNA-204, miRNA-210, miRNA-223, and miRNA-424 were determined by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Concentrations of APLN, kynurenine, and endocan were analyzed by ELISA method.

RESULTS: mRNA expressions of *HIF*-2 *alfa* and *STAT*-3 were increased; miRNA-210 and miRNA-130a were increased; miRNA-204 was decreased in PH. APLN and kynurenine concentrations were decreased in PH. There was positive correlation: APLN-miRNA-424: $r=0,309$, $p=0,024$. There were negative correlations: *FGFR*-1-miRNA-210: $r=(-)0,288$,

p=0,042; *FGF-2*-miRNA-204: $r=(-)0,452$, p=0,001; *HIF-2 α* -miRNA-204: $r=(-)0,357$, p=0,014; *HIF-2 α* -miRNA-223: $r=(-)0,359$, p=0,025.

CONCLUSIONS: Our study findings support development of novel therapeutic strategies targeting inhibition of; miRNA-130a, miRNA-210, *HIF-2 alfa* and *STAT-3* signaling and stimulate APLN, kynurenine, miRNA-204 concentrations. We report a novel relationships between APLN-miRNA-424, *FGFR-1*-miRNA-210, *FGF-2*-miRNA-204, *HIF-2 α* -miRNA-204 and *HIF-2 α* -miRNA-223 in PH patients.

1.

GİRİŞ VE AMAÇ

Pulmoner hipertansiyon (PH) tanısı konulduğunda klinik olarak ilerlemiş olan, ciddi mortalite ve morbititeye neden olabilen bir hastalıktır. Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) pulmoner arteriyel endotel hücreleri (PAEC), pulmoner arteriyel düz kas hücreleri (PASMC), fibroblastları da içeren birden fazla hücre modelinde yeniden şekillenmeden oluşan kompleks bir hastalıktır. Bu durum pulmoner vasküler sistemde hiperproliferasyon, vazokonstrüksiyon, düz kas hipertrofisi gibi sonuçlara yol açan bir dizi olay sonucunda gelişmektedir (1).

MikroRNA (miRNA) disregülasyonunun, yapılan çalışmalarda PH gelişimi ve progresyonunda önemli bir rol aldığı tespit edilmiştir. miRNA küçük, kendi başına kodlama yapamayan ancak gen ekspresyonunu etkileyen RNA moleküllerinden oluşur. İnsan genomunda yaklaşık 5500 çeşidi saptanmıştır. Primer ve prematüre miRNA'lar çekirdek ve sitoplazmada işleme tabi tutularak aktiflenmektedirler. Aktif miRNA'lar çift sarmallı, 17-24 nükleotit uzunluğundadır (2).

PH gelişmiş PASMC'de transkripsiyonun sinyal iletici ve aktive edicisi 3(STAT-3), düz kasa özgü miRNA-204'ü down regüle ederek, hücresel proliferasyonu arttıran SRC kinaz'ı aktifler. Benzer şekilde apelin (APLN) down regülasyonu sonrası miRNA-424/503 azalarak PAEC'de Fibroblast büyüme faktörü (*FGF-2*) aracılığı ile proliferasyonu tetiklediği saptanmıştır (3).

Monocrotaline (MCT) ile oluşturulan PH de endokan seviyesinin normalin çok üzerinde olduğu görülmüştür (4). miRNA-17, miRNA-21, miRNA-130, miRNA-145 yapılan çalışmalarda PH gelişimine aracılık yaptıkları saptanmıştır (5).

Triptofan metaboliti olan kinürenin idiyopatik pulmoner hipertansiyon (İPAH) hastalarında yapılan bir çalışmada anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (6).

PAH yönetimindeki güncel tedaviler ile hastalığın prognozu iyileştirilmiştir ancak mortalite ve morbitide halen yüksektir. Bu nedenle patofizyolojisinin anlaşılması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Buradan yola çıkarak bizim de bu çalışmada amacımız PAH'lı hastalarda miRNA düzeyleri ile ilişkili genlerin ekspresyonunun belirlenmesi ve APLN, endokan, kinürenin protein düzeylerindeki

değişimlerin PAH patogenezi üzerindeki rollerini incelemek ve literatüre yeni bilgiler kazandırmaktır. Böylelikle bu konuda daha fazla çalışma yapılması için bilim insanlarının dikkati bu hastalığa çekilerek yeni tedavi hedefleri geliştirilebilecektir.

2.

GENEL BİLGİLER

2.1. PULMONER HİPERTANSİYON

2.1.1. Tanım

Sağlıklı bireylerde sağ kalp kateterizasyonu (SKK) ile yapılan ölçüm sonrası istirahat ortalama pulmoner arter basıncı (OPAB) 14 ± 3 olarak saptanmakla beraber 20 mmHg'a kadar normal kabul edilmektedir. 2018 de yapılan PH Dünya Sempozyumunda prekapiller PH tanımlaması OPAB >20 mmHg, pulmoner arter kama basıncı (PAWP) ≤ 15 mmHg ve pulmoner vasküler direnç (PVR) ≥ 3 Wood Ünit (WU) üzerinde olması olarak revize edilmiştir.

Tedaviye verdikleri yanıtları, hemodinamik özellikleri, klinik ve patolojik bulguları ile beraber değerlendirildiğinde beş tip PH klinik sınıfı bulunmaktadır. Bu sınıflama Tablo 1'de detaylı bir şekilde verilmiştir (7).

2.1.2. Epidemiyolojisi

PH hastaları hakkındaki kayıtlar kısıtlıdır. Bunun yanında Birleşik Krallık'ta milyonda 97 vaka, Fransa'da ise milyonda 5-52 vaka olarak yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Kadın/Erkek oranı ise bazı çalışmalarda 1.8 olarak raporlanmıştır. Yaş standartlandırılmış ölüm oranları Amerika'da 4.5-12.3 arasında olarak hesaplanmıştır. Tabi bu değerler PH tipleri arasında farklılık göstermektedir. Gruplar arasında en sık hangi grubun baskın olduğu konusunda net bilgi olmasa da Grup 2 sol kalp hastalıklarına bağlı PH'nin daha fazla olduğu düşünülmektedir.

Tablo 1. Pulmoner hipertansiyon klinik sınıflandırması

1. Pulmoner arteriyel hipertansiyon
1.1 İdiopatik 1.2 Genetik 1.3 İlaç ve toksine bağlı 1.4 İlişkili; 1.4.1 Bağ doku hastalığı 1.4.2 İnsan immün yetmezlik virus (HIV) enfeksiyonu 1.4.3 Portal Hipertansiyon 1.4.4 Konjenital Kalp Hastalığı 1.4.5 Şistozomiyazis 1.5 Uzun süreli kalsiyum kanal blokerlerine cevap veren 1.6 Pulmoner venookluziv hastalık ve/veya pulmoner hemanjiomatozis 1.7 Yenidoğanın persistan pulmoner hipertansiyonu
2. Sol kalp hastalığına bağlı pulmoner hipertansiyon
2.1 Korunmuş LVEF Kalp yetmezliği 2.2 Azalmış LVEF Kalp yetmezliği 2.3 Kapak hastalığı 2.4 Postkapiller PH'ye neden olan konjenital/kazanılmış kardiyovasküler durumlar
3. Akciğer hastalığı ve/veya hipoksiye bağlı pulmoner hipertansiyon
3.1 Obstruktif akciğer hastalığı 3.2 Restriktif akciğer hastalığı 3.3 Mikst restriktif ve obstruktif paternlerin olduğu diğer akciğer hastalıkları 3.4 Akciğer hastalığı olmadan hipoksi 3.5 Gelişimsel pulmoner hastalıkları
4. Kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon ve diğer pulmoner arter obstrüksiyonları
4.1 Kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon 4.2 Diğer pulmoner arter obstrüksiyonları
5. Sebebi bilinmiyen ve/veya multifaktöriyel mekanizma ile gelişen pulmoner hipertansiyon
5.1 Hematolojik hastalıklar 5.2 Sistemik hastalıklar ve metabolik hastalıklar 5.3 Diğer 5.4 Kompleks konjenital kalp hastalıkları

Yapılan büyük PAH çalışmalarında hastaların yaklaşık yarısını IPAH ve Herediter pulmoner arteriyel hipertansiyon (HPAH) oluşturmakta iken geri kalan grupta başı bağ

doku hastalıklarından özellikle skleroderma çekmekteydi. Kalan grupta bağ doku hastalıklarından sonra konjenital kalp hastalıklarına bağlı PH sık olarak izlendi. Çin’de yapılan çalışmalarda ise konjenital kalp hastalıklarına bağlı PH bağ doku hastalıklarından daha fazla olarak bulundu (8,9)

2.1.3. PAH Tanım

PAH, PH’nin beş klinik sınıflamasından birincisidir. Diğer nedenler dışlandıktan sonra SKK’da PAWP ≤ 15 mmHg, PVR ≥ 3 WU ve OPAB >20 mmHg olarak saptanması ile tanı alır. Hemodinamik olarak PH prekapiller ve postkapiller olmak üzere ikiye ayrılır. PAH prekapiller PH olarak değerlendirilir (8). (Tablo 2)

Tablo 2. Pulmoner hipertansiyon hemodinamik sınıflandırması

TANIMLAMA	KARAKTERİSTİK	KLİNİK GRUPLAR
PREKAPİLLER PH	OPAB >20 mmHg PKWP ≤ 15 mmHg PVR ≥ 3 WU	1. Pulmoner arteriyel hipertansiyon 3. Akciğer hastalığına bağlı PH 4. Kronik tromboembolik PH 5. Sebebi bilinmiyen ve/veya multifaktöriyel mekanizma ile gelişen PH
İZOLE POSTKAPİLLER PH	OPAB >20 mmHg PKWP >15 mmHg PVR < 3 WU	2. Sol kalp hastalığına bağlı PH 5. Sebebi bilinmiyen ve/veya multifaktöriyel mekanizma ile gelişen PH
KOMBİNE PRE-POSTKAPİLLER PH	OPAB >20 mmHg PKWP >15 mmHg PVR ≥ 3 WU	2. Sol kalp hastalığına bağlı PH 5. Sebebi bilinmiyen ve/veya multifaktöriyel mekanizma ile gelişen PH

PAH; İPAH, ilaçlara bağlı PAH, HPAH ve diğer sebeplere bağlı PAH olmak üzere 4 alt başlık altında toplanabilir. Pulmoner veno-okluziv hastalık ve yenidoğanın persistan PH’i, PAH alt gruplarına yakın olmasına rağmen bazı farklılıklarından ötürü Grup 1 PH içinde farklı başlık olarak değerlendirilmiştir (10,11)

2.1.4. PAH’da Patoloji

PH ileri evrelerinde hastalarda ortak görülen klinik sağ kalp yetmezliği olup bu

PVR artışına bağlı gelişmektedir. PVR artışı için sadece akım artışı tek başına yeterli değildir. Akım artışını basınç artışı da takip etmesi gerekmektedir. PVR artışı farklı etiyolojiler sonrasında meydana gelir. Bunlar: İPAH, bağ doku hastalıkları gibi hastalıklar sonucu küçük arter ve arteriyollerde oluşan ilerleyici tıkanma ile, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), Alveolar hipoventilasyon gibi durumlarda hipoksiye bağlı gelişen vazokonstrüksiyon ile; pulmoner emboli gibi durumlarda vasküler sistemde alan azalması ile, atriyal septal defekt (ASD), ventriküler septal defekt (VSD) gibi konjenital kalp hastalıklarında vasküler sistemde artmış kan akımı ile, sol kalp hastalıklarına bağlı durumlarda pulmoner venöz basınç artışına bağlı gelişmektedir (12,13).

PAH'da distal pulmoner arterlerin etkilenmesi patolojik incelemede sık olarak primer pulmoner arteriopati, trombotik arteriopati ve pleksojenik arteriopati olarak görülmektedir (14,15). Patolojide bir çok mekanizmanın yol aldığı bilinmektedir. Ancak sonuçta vazokonstriktör ile vazodilatatör mediyatörlerin arasındaki dengenin bozulmasına bağlı vazokonstriksiyon baskınlığı izlenmektedir. Buna ek olarak endotel hasarı, matriks protein düzeyindeki değişimler, endotel yapısındaki değişiklikler, düz kastaki oluşan değişiklikler, trombositler düzeylerindeki değişimler, büyüme faktörlerindeki değişimler de meydana gelmektedir (16). Histopatolojik olarak ise PH'de en sık tüm arter katmanlarında hasar, medial hipertrofi, intima tabakasında fibrotik lezyonlar ile organize trombüsden oluşan pleksojenik pulmoner arteriopati görülür. Bu endotel çoğalması sırasında düzensizlik sonrasında meydana gelmektedir (14,17).

2.1.5. Klinik Bulgular

Klinik PH için özgül değildir. Bulgular ve semptomlar altta yatan etyolojiye bağlı değişmekte iken ileri evrelerde sağ kalp yetmezliği semptom ve bulguları ön planda izlenmektedir. Hastalarda efor dispnesi, halsizlik, yorgunluk, angina, senkop, karın şişliği şikayetleri ile hasta kliniğe başvurabilir (18). Fizik muayenede triküspit yetersizliğine bağlı pansistolik üfürüm, diyastolik pulmoner yetmezlik üfürümü, S2'de

şiddetlenme, S3 varlığı, parasternal lift olarak bilinen sol parasternal alanda sağ ventrikül kasılmasına bağlı sternum yükselmesi, juguler venöz dolgunluk, asit, hepatomegali, periferik ödem görülebilir (19).

Efor dispnesi hastaların çoğunda sağ kalp yetmezliğinin en erken belirtisidir ve sağ ventrikül akım rezervinde azalma ile ilişkilidir (20). Yine akım rezervinde azalma sonucu senkop gelişebilir. Kronik böbrek yetersizliği ve hiponatremi sol kalp yetmezliği hastalarında olduğu gibi gelişmektedir (21). Efor kısıtlanması ve kas yorgunluğu hastalarda periferik akımın bozulması sonucu artan laktik aside bağlı artmaktadır (22). Siroz ciddi sağ kalp yetmezliğinin geç döneminde görülmektedir. Hızlı kötüleşen hipoksemi varlığında patent foramen ovale'ye bağlı sağdan sola şant geliştiği düşünülmelidir. Hastalar akut kalp yetersizliği ile başvurabilir. Bu hastalarda kısa dönem mortalitenin %40'a kadar yükselebileceği gösterilmiştir (23).

2.1.6. Genetik

HPAH hastalarının yaklaşık %75'inde sorumlu 300'den fazla bağımsız kemik morfogenetik protein reseptörü tip 2 (BMP2) mutasyonu saptanmıştır. BMP2, transforme edici büyüme faktörü (*TGF-β*) ailesinin tip II reseptör üyesinin kodlanmasını sağlar. PAH saptanan ve genetik olduğu düşünülen sporadik vakalarda %25'e varan oranlarda bu gende mutasyon bulunmuştur (24). Birden çok aile bireyinde bulunan aktivin 8 reseptörü benzeri kinaz tip 1 (ALK-1) reseptöründe ve ciddi oranda daha düşük sıklıkta endoglin tip 3 (ENG) reseptöründe saptanan mutasyonlar kalıtsal hemorajik telenjiyektazi ile ilişkili PAH gelişmesine sebep olmaktadır (25). *TGF-β* ailesinin PAH gelişimindeki önemli rolü bu mutasyonlar ile ortaya konulmuştur. Akciğer endotelial hücrelerinde bol miktarda bulunan caveolin-1 (CAV1) olarak adlandırılan membran proteini olan caveolayı kodlayan gendeki mutasyon yine PAH ile ilişkilendirilmiştir (26). Yine benzer şekilde PAH ile ilişkisi saptanan bir diğer mutasyon, KCNK3 denilen ve pH duyarlı potasyum kanalı süper ailesi K üye-3'ü kodlayan gendeki mutasyondur (27). Bu kanalın hipoksiye duyarlı olduğu saptanmıştır (28).

2.2. Pulmoner Hipertansiyonda Ekokardiyografi

PH'de tanı, tedavi takibi ve prognozun belirlenmesinde ekokardiyografi çok önemlidir. Ekokardiyografi ile pulmoner basınçlar non invaziv bir şekilde değerlendirilmekle beraber eşlik eden sol kalp hastalığının varlığı, PH sonucunda sağ atriyum ve sağ ventrikülde meydana gelmiş değişiklikler değerlendirilebilmektedir. Sağ boşluklar iki boyutlu ekokardiyografi, geleneksel Doppler ekokardiyografi, M mod ekokardiyografi, üç boyutlu ekokardiyografi ve doku Doppler ekokardiyografi ile değerlendirilmektedir.

2.2.1. İki Boyutlu Ekokardiyografi

PH olan bireylerin çoğunda iki boyutlu ekokardiyografide sağ ventrikül ve atriyal genişleme ilk olarak göze çarpmaktadır. Bu değerlendirme hem görsel olarak kalitatif, hem de ölçümler sonrasında kantitatif olarak saptanmaktadır.

Kalitatif olarak sağ kalp yapıları sol kalp yapılarına göre daha geniş olarak izlenmektedir. Normalde sağ ventrikülün kalp apeksine kadar uzanmayıp, tabanı triküspit anülüs düzlemi olan sağ ventrikülün sol ventrikülün uzun eksen uzunluğunun 2/3'ünü geçmemesi gerekir. Eğer bu oran 2/3'ü geçmiş ancak 1/1 oranından küçükse hafif sağ ventrikül genişlemesinden, oran 1/1 ise orta derecede genişlemeden ve 1/1'den büyük ve apeksin büyük kısmını veya tamamını sağ ventrikül oluşturuyorsa ileri genişlemeden söz edilebilir. Buna benzer yöntemle sağ atriyumun görsel olarak sol atriyum boyutlarından geniş olması sağ atriyal dilatasyonu düşündürür (29).

2.2.2. M-Mod Ekokardiyografi

Apikal dört boşluk görüntüsünden sağ ventrikül sistolik fonksiyonunu değerlendirmek mümkündür. Triküspit anüler planda sistolik yer değiştirmesi (TAPSE) triküspit kapak hareketinin sistol sırasında apekse doğru hareketinin apikal dört boşluk görüntüsünde lateral triküspit anülüsüne M mod yerleştirilerek ölçülmesidir. Kolay ve basit

bir teknik olup, sağ ventrikül sistolik fonksiyonları hakkında doğrudan bilgi verdiği ve sağ ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile ilişkisi gösterilmiştir (30).

2.2.3. Konvansiyonel Doppler Görüntüleme

Sağ ventrikül aynı zamanda Doppler ile değerlendirilmektedir. Konvansiyonel Doppler değerlendirmede, sürekli dalga (CW) Doppler, renkli Doppler ve pulse dalga (PW) Doppler tekniklerini içerir. Pulmoner kapak akımı ve triküspit yetersizlik hızı değerlendirilir. Pulmoner kapakta veya sağ ventrikül çıkış yolunda (SĖVÇY) darlık olmadığında sistolik pulmoner arter basıncı (SPAB)'nın sağ ventrikül sistolik basıncına (SĖVSB) eşit olduğu kabul edilir. Triküspit yetersizlik velositesi (TRV) üzerinden yapılan ölçüm, tahmini SPAB hesabında en güvenilir yöntemdir. İlk olarak TRV'nin Doppler ekokardiyografik inceleme ile kaydedilmesi, 1984 yılında Yock ve ark. tarafından sağ kalp yetersizliği kliniği saptanan 62 hastalık bir çalışma ile gösterilmiştir. TRV'nin pik hızını sadeleştirilmiş Bernoulli denklemiyle kullanarak trans triküspit gradiyenti hesaplamışlar ve sağ atriyum basıncını (SĖAB) bu değer ile topladıklarında SKK ile elde edilen SĖVSB'a çok yakın değerleri elde etmişlerdir. TRV ile SĖVSB doğrudan ilişkilidir. SĖAB ve TRV ile Bernoulli denklemini kullanarak SĖVSB'yi hesaplamak mümkündür.

$$SĖVSB = 4 (TYV)^2 + SĖAB$$

Triküspit yetersizlik akımından CW ile hesaplanan triküspit yetersizlik akımındaki maksimum hızı TRV'i, SĖAB ise tahmini değeri ifade eder. Basit ve doğru bir hesaplama yöntemidir. İki boyutlu ekokardiyografide subkostal değerlendirme ile, inferiyor vena cava (İVC) çapı ve solunumsal olarak çap değışikliği SĖAB hesaplamada kullanılır. İVC <2.1 cm çapta ve inspiriyum ile İVC çapında %50'dan fazla değışiklik meydana geliyorsa SĖAB normal aralıkta yani 0-5 mmHg (ortalama 3 mmHg), İVC >2.1cm geniş olmasına rağmen inspiriyum ile %50'den fazla değışim meydana geliyorsa ya da İVC <2.1 cm olmasına rağmen inspriyum ile çapta %50'den daha az değışim meydana geliyorsa SĖAB 5-10 mmHg (ortalama 8 mmHg), İVC geniş ve inspriyum ile çapta %50'den daha az değışim olursa SĖAB 10-20 mmHg olarak kabul edilir (29,30).

TRV'yi ölçmenin zor olduğu durumlarda ajite serum verilebilir. Ajite serum ile belirginleşen triküspit yetersizlik akım trasesi ile TRV değerlendirilmesi daha doğru olabilir. Pulmoner akım, zirve hızına sistol ortasında ulaşan simetrik kontürlere sahiptir. Zirve hızın sistolün erken evrelerinde olması pulmoner basıncın arttığını gösterir. Bu nedenle Pulmoner kapak üzerinde hesaplanan ve başlangıçtan zirve akım hızına kadar olan zaman olarak ifade edilen pulmoner akselerasyon zamanının (PAZ) ölçülmesi OPAB hakkında bilgi verebilir (31). PAZ ile Pulmoner arter basıncı ters orantılıdır. Formülde PAZ kullanılarak OPAB hesaplanabilir (32).

$$OPAB = 79 - (0.45 \times PAZ)$$

İnvaziv olarak transpulmoner basınç gradiyentinin, transpulmoner akıma bölünmesi ile PVR elde edilir (33). PVR aynı zamanda Ekokardiyografi aracılığıyla TRV ve SĞVÇY hız zaman intervalinin (TVI) kullanıldığı bir formülle hesaplanabilir (34).

$$PVR (EKO) = [(TYV / SĞVÇY TVI) + 0.16] \times 10$$

Ekokardiyografik incelemede PH olasılık düzeyi belirlemek hedeflenmelidir. Semptomatik hastalarda ekokardiyografide tespit edilen TRV ölçümü ve PH şüphesi olan hastalarda ekokardiyografi ile VCI, pulmoner arter, sağ ventrikül ve sol ventrikül boyutları üzerinden yapılan ölçümlerle PH olasılığı belirlenmeli ve buna göre hastanın takip edilmesi, tedavi düzenlenmesi, sağ kateter planlanması kararları verilmektedir. Tablo 3'de gösterilmiştir (8).

Tablo 3. Ekokardiyografik inceleme ile Pulmoner hipertansiyon olasılığını değerlendirme

Zirve triküspit regürjitasyon velositesi (TRV) (m/s)	EKO'da diğer PH bulgularının varlığı	Ekokardiyografik PH olasılığı
≤ 2.8 ya da ölçülemeyen	Hayır	Düşük
≤ 2.8 ya da ölçülemeyen	Evet	Orta
2.9-3.4	Hayır	
2.9-3.4	Evet	Yüksek
>3.4	Gerekli değil	

Ekokardiyografide hesaplanan TRV <2.8 m/s ve diğer PH bulguları görülmediği zaman ekokardiyografik olarak PH olasılığı düşük olarak değerlendirilir. Eğer TRV <2.8 m/s olmasına rağmen diğer ekokardiyografik PH bulguları varsa (Tablo 4), ekokardiyografik olarak PH olasılığı orta olarak değerlendirilir. TRV 2.9-3.4 m/s arasında iken diğer PH bulguları yoksa olasılık orta olarak değerlendirilirken, diğer PH bulguları varsa olasılık yüksek olarak değerlendirilir. TRV >3.4 m/s ise diğer PH bulgularına bakılmaksızın olasılık yüksek olmaktadır.

Tablo 4. Ekokardiyografik deęerlendirmede dięer Pulmoner hipertansiyon dūřindüren bulgular

Ventrikül	Pulmoner arter	İnferior vena cava ve sağ atriyum
Bazal Sağ ventrikül/sol ventrikül oranı >1.0	Sağ ventrikül çıkış yolu akselasyon zamanı <105 msn ve/veya midsistolik çentiklenme	İnferior vena cava >21 mm ve azalmış inspiratuvar kollaps (zorlu inspiriyum ile <%50 azalma, olağan inspiriyum ile <%20 azalma)
İnterventriküler septumda dūzleřme (sistol ya da diyastolde sol eksantrik indeksi >1.1)	Erken diyastolik pulmoner regürjitasyon velositesi >2.2 m/sn	Sistol sonu sağ atriyum alanı >18 cm ²
	Pulmoner arter >25 mm	

PH olasılığı ve PH bulguları değerlendirilen hastaların takibi ve ileri işlemler açısından bu mevcut ölçümlerle değerlendirme yapılmaktadır. PH olasılığı dūřük olan, PAH ve Kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon (KTEPH) için risk faktörleri ya da ilişkili durumlar yoksa bu hastalarda alternatif tanıya yönelmeli; PAH ve KTEPH için risk faktörleri ya da ilişkili durumlar varsa ekokardiyografi takibine hasta alınmalıdır. PH olasılığı orta olan, PAH ve KTEPH ile risk faktörleri ya da ilişkili durumlar yoksa bu hastalarda alternatif tanıya yönelmeli ya da bireysel özelliklerine göre ileri tanı yöntemlerine başvurulmalı; PAH ve KTEPH ile risk faktörleri ya da ilişkili durumlar varsa mutlaka ileri tanı yöntemlerine başvurulmalıdır. PH olasılığı yüksek olan, PAH ve KTEPH için risk faktörleri ya da ilişkili durumlar yoksa bu hastalarda da ileri inceleme yöntemlerine başvurulmalı; PAH ve KTEPH için risk faktörleri ya da ilişkili durumlar varsa bu hastalara hem ileri inceleme yöntemleri hem de SKK planlanmalıdır (8). (Tablo 5).

Tablo 5. PH ekokardiyografik olasılığına göre, PAH ya da KTEPH için, PH klinik bulguları olan , PH risk faktörü olan ya da olmayan hastalarda önerilen olası PH tanı yönetimi

PH olasılığı	PAH ve KTEPH için risk faktörleri ya da ilişkili durumlar yoksa	Klas	Düzyey	PAH ve KTEPH için risk faktörleri ya da ilişkili durumlar varsa	Klas	Düzyey
Düşük	Alternatif tanı düşünülmeli	I a	C	EKO takibi düşünülmeli	I a	C
Orta	Alternatif tanı, EKO takibi düşünülmeli	I a	C	PH için ileri inceleme düşünülmeli	I a	C
	PH için ileri inceleme belki düşünülebilir	I b				
Yüksek	PH için ileri inceleme yapılmalı	I	C	PH için Sağ kalp kataterizasyonu içeren ileri inceleme yapılmalı	I	C

2.2.4. Doku Doppler Görüntüleme

Doku Doppler ölçümleri ile sistolik ve diyastolik velositeler elde edilir. Bazal miyokardiyumun kalbin uzun eksenine paralel olarak apekse doğru longitudinal hareketinin hızı sistolik miyokart velositesi (S') olarak adlandırılır. Triküspit yan halkası seviyesinden elde edilen dalga, kolay ölçülebilen ve sağ ventrikül sistolik fonksiyonu hakkında güvenilir bilgi veren bir değerlendirmedir. Anülüs ölçüm sırasında Doppler hüzmesiyle paralel olmalıdır. Erken diyastolik velosite E', geç diyastolik velosite A' olarak adlandırılır.

2.2.5. Üç Boyutlu Ekokardiyografi

Kalp anatomisinin Doppler akım görüntüleme, M-mod ekokardiyografi, doku

Dopplerin de dahil diğer tđm tekniklerin birlikte kullanılabilirdiği biçimde gerđek zamanlı, ¼ boyutlu olarak gđrđnt¼lenebilmesidir.

Yeni nesil 2000-3000 gđrđnt¼leme elementinden oluşan matriks problemler bu işlemde kullanılmaktadır. Piramidal bilgi diziliminin toplanabilmesi teorik ağıdan m¼mk¼nd¼r. Elektrokardiyogram ile tetiklenen, tam piramit olmayan dđrt ya da beş ayrı hacim elde edilerek bunlar tek bir tam hacim olacak şekilde birleştirecektir. Alt-hacim bilgilerinin gerđek zamanlı ¼ boyutlu olarak elde edilmesi diğer bir yaklaşımdır. Onaylanmış gerđek zamanlı ¼ boyutlu algoritmaları, sağ ventrik¼l ejeksiyon fraksiyonu ve hacimlerinin ¼l¼lebilmesi ¼ok ¼nemli bir avantajdır (35).

2.3. Pulmoner Hipertansiyonda Elektrokardiyografi

PH'yi d¼ř¼nd¼ren bulgular elektrokardiyografi (EKG)'de sağ ventrik¼l hipertrofisi ve strain bulgusu, sağ atriyal dilatasyon gđr¼lmesidir fakat tamsal değildir. İPAH hastalarının %87'sinde EKG'de sağ ventrik¼l hipertrofisi, %79'unda ise sağ aks sapması vardır (1). EKG duyarlılığı (%55) ve ¼zg¼ll¼đ¼ (%70) PH'de d¼ř¼k olması nedeniyle tarama yđntemi olarak kullanılmamaktadır (36). Supraventrik¼ler aritmiler (atriyal flutter, atriyal fibrilasyon) hastalığın ileri evrelerinde gđr¼l¼p hastanın genel durumunun bozulmasına yol ağtığı i¼in EKG takibi ¼nemlidir (22).

2.4. Toraks Grafisi

Tanı aşamasında İPAH hastalarının %90'ında toraks grafisinde patoloji gđzlenmektedir (1). Santral pulmoner arterde dilatasyon, buna karşılık periferik kan damarlarında kayıplar (budanma) saptanır. Klinik olarak ilerleyen vakalarda sağ atriyumda ve sağ ventrik¼lde genişleme saptanabilir. Toraks grafisi akciğer ile ilişkili grup 3 hastalıklarının ve sol kalp hastalığına bağlı Grup 2 hastalarının dışlanmasını kolaylaştırır. Radyografik anormalliklerle PH derecesi doğru orantılı değildir (36).

2.5. Solunum Fonksiyon Testleri

Altta yatan hava yolu ya da akciğer parankim hastalığının değerlendirilmesinde solunum fonksiyon testleri (SFT) ve arteriyel kan gazları ¼nemlidir. PAH hastalarında

akciğer hacimlerinde hafif-orta derecede azalma ile beraber dinlenme esnasında akciğerde karbon monoksit difüzyon kapasitesi genellikle düşüktür (%40–80'i arasında) . Arteriyel karbondioksit düzeyi alveoler hiperventilasyon nedeniyle genellikle azalmış olup, arteriyel oksijen düzeyi normaldir ya da normalin yalnızca biraz altındadır. Akciğer hastalıklarına veya hipoksiye bağlı olan grup 3 PH olan hastalar solunum fonksiyon testindeki ve kan gazındaki değişikliklere göre belirlenebilir (18,36).

2.6. Ventilasyon/Perfüzyon Akciğer Sintigrafisi

KTEPH varlığını saptamak ya da dışlamak için PH hastalarında ventilasyon/perfüzyon akciğer sintigrafisi yapılabilir. Bilgisayarlı tomografi (BT)'den duyarlılığı daha yüksek olduğu için öncelikli tarama yöntemidir. Ventilasyon/perfüzyon sintigrafisi sonucu normal ya da düşük olasılık saptanması halinde KTEPH tanısı %90–100 duyarlılıkla ve %94–100 özgüllükle dışlanabilir (37). Ventilasyon/perfüzyon akciğer sintigrafisi PAH hastalarında normal sonuçlanabilir, fakat perfüzyonda periferde eşleştirilemeyen ve segmental olmayan küçük defektler de görülebilir.

2.7. Yüksek Çözünürlüklü Bilgisayarlı Tomografi, Kontrastlı Bilgisayarlı Tomografi ve Pulmoner Anjiyografi

Akciğer parankimini detaylı olarak görüntüleyebilmesi ile interstisyel akciğer hastalığı, amfizem gibi PH'ye sebebiyet veren akciğer hastalıklarının tanısını yüksek çözünürlüklü BT (YÇBT) kolaylaştırır. Yaygın santral buzlu cam görünümü ve interlobüler septumlarda kalınlaşma, interstisyel ödem değişiklikleri YÇBT'de görülürse Pulmoner venookluziv hastalığı düşündürür (38). Kontrastlı BT anjiyografi KTEPH hastalarında cerrahi tedavinin (endarterektomi) uygunluğunu değerlendirmede kullanılmaktadır. Pulmoner arterlerde tam tıkanma, bantlar ve ağlar (web) gibi görüntülerin BT anjiyografide saptanması KTEPH hastalarında tipiktir. Ayrıca eşlik eden intimal düzensizliklerin görülmesi güvenilir bir biçimde KTEPH'i saptayabilmektedir (39,40).

2.8. Sağ Kalp Kateterizasyonu ve Vazoreaktivite

SKK ile PH tanısını doğrulamak, hemodinamik bozukluk derecesini belirlemek ve vazoreaktivite testini yapmabilmek mümkündür. Pulmoner arter basıncı (sistolik,

diyastolik ve ortalama), SĞAB, PAWP ve sağ ventrikül basıncı SKK ile ölçülmektedir. Termodilüsyon, Fick yöntemleri, bazen de biyoempedans yöntemi kalp debisi ölçümü için kullanılmaktadır. Fick yönteminin sistemik-pulmoner şant varlığında kullanılması gerekmektedir. PVR, Pulmoner arter ve sistemik arter kanlarında oksijen satürasyonu ölçülerek hesaplanmaktadır (41). SKK ile OPAB'ın >20 mmHg, PVR'nin ≥ 3 WU hesaplanması ile PH tanısını koydurur. PAWP değerinin ≤ 15 mmHg olması prekapiller PH, PAWP >15 mmHg olması halinde ise postkapiller PH düşünölmelidir (7). Grup 2-5 PH hastalarında akut vazoreaktivite testinin yapılması önerilmemektedir (36). İPAH, HPAH, ilaca bağlı PAH'da uzun süreli kalsiyum kanal blokleri tedavisinden yarar görecek hastaları belirleyebilmek için SKK işleminin sırasında vazoreaktivite testi uygulanmaktadır (42,43). Akut vazodilatör testinde en yaygın kullanılan ilaç nitrik oksit (NO)'dur (37). NO dışında intravenöz (iv) eprostenoil veya iv adenozin (ancak sistemik vazodilatör etki riski vardır) de kullanılabilir (44,45). Vazoreaktivite testinde kalp debisinin arttığı ya da değişmediği koşullarda OPAB değerinde ≥ 10 mmHg azalma ve mutlak OPAB değerinin 40 mmHg altında olması pozitif yanıt olarak değerlendirilmektedir. İPAH hastalarının yalnızca yaklaşık %10'u vazoreaktivite testine pozitif yanıt vermekle birlikte bu pozitif akut yanıt veren İPAH hastalarının da yaklaşık yarısında kalsiyum kanal blokörlere uzun süreli tedavide cevap alınmaktadır ve sadece bu vakalarda tek tedavi olarak kalsiyum kanal blokörlerinin kullanılması düşünölmelidir (43).

2.9. Natriüretik peptitler

Miyokard duvar stresine bağlı olarak salınımı artan atriyal natriüretik peptid (ANP) ve B-tipi natriüretik peptid (BNP), vazodilatasyon ve natriüreze neden olan protein yapıda olan hormonlardır. Yapılan çalışmalar sonrasında sağ ventrikül yetersizliğinin takibinde gösterilen ilgi daha çok BNP lehine gelişmiştir. BNP sentezindeki en son aşama, öncülü olan yüksek molekül ağırlıklı proBNP'den biyolojik olarak aktif olmayan N terminal segmentine (NT-proBNP) ve düşük molekül ağırlıklı BNP'ye ayrılmasıdır. NT-proBNP'nin yarılanma ömrü daha uzundur. Sağ ventrikül yetersizliği PH'de başlıca ölüm nedenidir. BNP/NT-proBNP düzeyleri sağ ventrikül

işlev bozukluğunun ağırlık derecesini gösterebilmektedir. BNP değerinin 180 pg/ml ve NT-proBNP değerinin 1400 pg/ml üzerinde olmasının, uzun dönemde kötü sonlanımla ilişkili olduğu gösterilmiştir (46). Aynı zamanda takiplerde NT-proBNP düzeylerinde yükselme olması da kötü prognozu gösterirken bunun zıddı olarak takipte azalan ya da stabil seyreden BNP/NT-proBNP değerleri tedavinin başarılı olduğunu göstermektedir (47). BNP/NT-proBNP düzeyleri hem başlangıçta riski belirlemede, hem de takiplerde tedavi etkinliğini değerlendirmek için oldukça önemlidir (48).

2.10. MikroRNA mekanizması ve pulmoner hipertansiyondaki rolü

PAH pulmoner damarlarda hücre duvarında kalınlaşma artışı ile vasküler direncin arttığı bir hastalıktır. Bu durumda damar hücreleri ve kan hücrelerinin birbirleri ile etkileşimi ile dolaşımda bulunan makrofaj, monosit gibi immün hücrelerin aktivasyonu gerçekleşir ve bu etkileşim sonucunda endotel disfonksiyonu, fibroblast aktivasyonu ve düz kas aktivasyonu gibi komplikasyonlar meydana gelir. Aktiflenen immün sistem sonucunda düz kas hücreleri etkilenip damar duvarında kalınlaşma gerçekleşir. Vasküler yeniden şekillenmede adventisyada yer alan fibroblast, tunika mediada yer alan düz kas hücreleri, intimada bulunan endotel hücreleri, kanda da makrofajdan oluşan dört ana hücre grubu ana rol almaktadır. İşte bu hücre gruplarının aktivasyonundaki mekanizmalar tam olarak net değildir. miRNA'ların bazı çalışmalarda bu hücre gruplarının aktivasyonunda rol alabilecekleri gösterilmiştir (49). miRNA'lar hedef genlerin protein kodlama üzerine düzenleyici olan mRNA'ları inhibe ya da aktive eden kodlayıcı olmayan RNA'lardır. miRNA biyogenezi bir miRNA geninin RNA polimeraz II/III aracılığı ile transkripsiyon işlemi ile başlar ve bunun sonucunda uzun bir primer (pri)-miRNA oluşturur. Çift zincir RNA bağlayıcı protein DGCR8'in Drosha enzim kompleksi ile yönlendirilmesi ile pri-miRNA işlenir bunun sonucunda çekirdekte 60-100 nükleotit boyutunda saç tokası şeklinde prekürsör (pre)-miRNA oluşur. Bu oluşan pre-miRNA, Exportin 5/Ran GTP ile çekirdekten çıkarılır. Pre-miRNA Dicer katalizli işleme alınarak 22 nükleotit boyutunda çift sarmallı olgun miRNA oluşturulur. Olgun miRNA'lar Argonaut 1-2 proteinlerinin de içinde olduğu proteinlerin de katılması ile kompleks

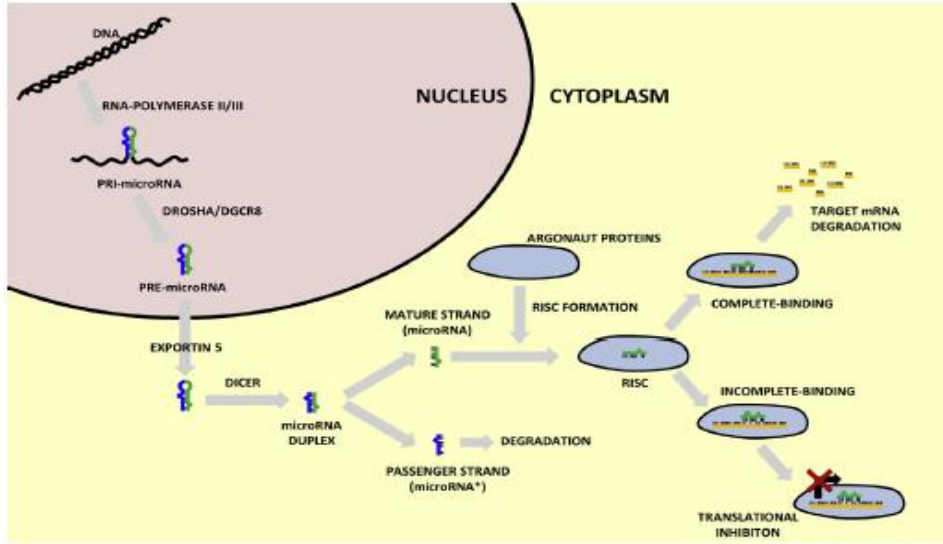
bir yapı olan RNA uyarılmış susturma kompleksi (RISC) adını alır. RISC de miRNA 'nin tamamlayıcılık derecesine bağlı olarak hedef gendeki translasyon olmamış bölgeye bağlanır ve bu da mRNA'nın stabilitesini azaltarak veya translasyonunu bloke ederek posttranskripsiyonel susturma olayına aracılık eder. İşlem bittiğinde mRNA ayrılır ve miRNA bir dizi işlem ile yıkılır (50). (Şekil 1)

Bir miRNA yüzden fazla gen ya da protein düzenlenmesinde rol alabilirken; birden fazla miRNA sadece bir protein ya da gen düzenlenmesinde rol alabilir. Tahmin edildiğine göre insan genomunun %30'u miRNA'lar aracılığı ile düzenlenmektedir. miRNA yaş, cinsiyet, zaman-mekansal faktörler, çevresel faktörler gibi birçok faktörden düzeyi etkilenmektedir. Örnek vermek gerekirse miRNA-17-92 embriyonik hücrelerde daha fazla bulunmaktayken yaşlanma ile düzeyi azalmaktadır. Yine miRNA-17-92 T hücre aktivasyonu olan dönemlerde artmaktayken hafıza hücrelerinin gelişimi esnasında ise salınımı azalmaktadır. Akciğerde miRNA düzeyleri cinsiyet, retionin düzeyi, *IGFRI*, Tp53, hipoksi gibi durumlarla değişmektedir. Landgraf ve ark. 26 farklı organ sisteminde 250'nin üzerinde küçük RNA kütüphanesinde doku-organ-hücre spesifik miRNA'ları yayınladı. Sonuç olarak bu miRNA'ların %97'sinin 300'den az olduğunu tespit ettiler. miRNA salınımının o dokunun mRNA sentez düzeyi ile korele olduğu, aralarında pozitif geri besleme olduğunu gösterdiler. miRNA-17-5p, miRNA-19a/b, miRNA-18a/b, miRNA-25'in düzeylerinin kanser hücrelerinde arttığı, miRNA-181a-1 ve miRNA-126'nın lösemide düzeylerinin azaldığı görüldü. Normal kişilerin ve PAH hastalarının akciğerlerinde miRNA düzeylerinde farklılıklar izlendi. Courboulin ve ark. 337 miRNA'yı kontrol ve PAH akciğerlerinde değerlendirdiklerinde 6 miRNA düzeyinin arttığını görürken, sadece miRNA-204 düzeyinin azaldığını tespit ettiler. Rhodes ve ark. 8 hasta ve sağlam kişilerin plazmasından yaptıkları mikroarray ölçümde 58 miRNA düzeyinin farklı olduğu, miRNA-150 düzeyinin plazmada en çok düşen miRNA olduğunu tespit ettiler. miRNA-210'nun sürekli bir şekilde hipoksi ile çeşitli hücrelerden salınımının arttığı görülmüştür. Fare akciğer PASMCM'lerinde hipoksi sonrasında miRNA-210'nun *HIF-1α* bağımlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Yine PAH hastalarında miRNA-424 ve miRNA-503 down regülasyonu sonrasında *FGF-2* ve *FGFR-1* aracılığı ile

PAEC ve PASMC’de hücre çoğalmasının arttığı da görülmüştür.

miRNA’ların PAH patogeneziindeki rolleri dikkatli bir inceleme ile değerlendirilmelidir. Genelde miRNA seviyeleri mikroarray görüntüleme yöntemleri ile, derin sekanslama işlemi ile, Northern blot analizi ile, gerçek zamanlı PCR ile, in-situ hibridizasyonu ile değerlendirilebilmektedir.

Son yayınlarda hücre dışı miRNA’ların protein kompleksleri ile ilişkili oldukları ve RNaz tarafından parçalanmaktan korunmakta olduklarını göstermektedir. Bu nedenle dolaşımında kararlı ve kolay tespit edilebilecekleri saptanmıştır. Bu gözlemler PAH hastalarında disregüle miRNA tespiti ile erken tanı konulabileceği yönündeki düşünceleri arttırmaktadır (51).



Şekil 1. MikroRNA sentezi ve olgunlaşması (50)

2.11. PAH’de mikroRNA ile ilişkili genler

miRNA’lar hedef genlerin protein kodlamaları üzerine düzenleyici olan mRNA’ları inhibe ya da aktive eden kodlayıcı olmayan RNA’lardır (50). PH’de yapılmakta olan çalışmalar sonrasında miRNA disregülasyonunun PASMC, PAEC, pulmoner arter adventisyasında proliferasyon ve apoptozisin önlenmesine yol açtığını göstermektedir.

miRNA'nın tümör supresyon üzerine etkisi üzerine yapılan çalışmalarda PAH gelişiminde miRNA-204'ün tümör supresyonu ile önemli bir etkisinin olduğu gözlenmiştir. *STAT-3* aktivasyonu sonrasında PAH'da azalmış miRNA-204 ekspresyonu neticesinde *STAT-3* ve bromodomain içeren 4 ekspresyonunun arttığı ve sonuç olarak nükleer faktör ve aktivatör T hücreleri, *HIF1- α* , Runt ilişkili transkripsiyon faktör 2'nin arttığı gözlenmiştir ki bunlar abartılı proliferasyon, kalsifikasyon, metabolik bozukluklara yol açmaktadır (2). *STAT* protein ailesi ilk olarak 1994'de akut faz reaktanı olarak gizli sitoplazmik transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. Bu ailenin 7 adet üyesi olmakta olup bunlardan birisi de *STAT-3*'dür. Dinlenme halindeki hücrelerde *STAT* pasif halde bulunurken, spesifik tirozin rezidüsünün fosforilasyonu ile *STAT* aktiflenmektedir. Fare ile yapılan çalışmalarda *STAT* ailesinin fizyolojik düzenlemelerde, embriyonik gelişimde, hücre farklılaşmasında, immün yanıtın oluşmasında, organogenezde önemli rolünün olduğu gösterilmiş olup *STAT-3* yokluğu farelerde erken embriyonik ölüm ile ilişkilendirilmiştir. 3. kromozomal bölgede yer alıp yaklaşık 750-850 aminoasitten meydana gelir. Bu 7 protein ailesinden, *STAT-3*'ün persistan aktivasyonu birçok kanser çeşidi ile ilişkilendirilmiş ve bu aktivasyon ile tümör hücrelerinde artmış hücre proliferasyonu, anjiogenez, apoptozis gecikmesi, invazyon ve metastaz gözlenmiştir (52).

HIF ilk olarak eritropoetin regülasyonu ile ilişkilendirilmiş olup bugün glikoliz, anjiogenez, hücre farklılaşması, apoptoz gibi birçok transkripsiyon mekanizmasında rol aldığı düşünülmektedir. Yakın zamanlı çalışmalarda *HIF*'nin sadece hipoksizde olmayıp normal oksijen şartlarında da vücut inflamasyonu ve bağışıklığının düzenlenmesinde önemli bir rol aldığını göstermiştir. *HIF* ailesi, *HIF-1*, *HIF-2*, *HIF-3* olmak üzere 3 gruba ayrılmakta olup en fazla şu ana kadar anlaşılan *HIF-1 α* 'dır. *HIF-1 α* ve *HIF-2 α* birbirine çok yakın olup benzer işlevleri vardır (53).

Yine başka bir çalışmada PAH gelişmiş insan PAEC'de miRNA-424 ve miRNA-503'ün down regüle olduğu gösterilirken, bu regülasyon değişiminin *FGF-2* ve *FGFR-1* ekspresyon artışı ile ilişkisi tespit edilmiştir. Bunun sonucunda PAEC ve PASMC'de proliferasyon artışı gerçekleşmiştir. PAEC'de oluşan proliferasyon artışı sonrasında

parakrin yolla PASMC'yi etkilediği de izlenmiştir (2). *FGF* ailesi 22 proteinden oluşur. Bunların fare ve insanda 18 tanesinin ligandı 4 tane tirozin kinaz reseptörü vardır. Birçok çalışmada *FGF* ailesinin erişkinde birçok homostatik mekanizmada ve hücre onarımında rolünün olduğu gösterilmiştir (54).

DNA hasarı PAH hastalarında klinik bulgular ortaya çıkmadan başlamaktadır. DNA hasarı dolaşan mononükleer hücrelerde, PASMC'de, PAEC'de görülmektedir. DNA hasarının miRNA-223 düşüşüne yol açtığı ve düşüş ile *PARP-1* artışının geliştiği gözlenmiştir. *PARP-1* artışı ile DNA hasarı artmakta ve DNA düzelmesi engellenmektedir. *PARP-1* aktivasyonu ile hücre ölümü azalmakta, hücre proliferasyonu artmaktadır. Bu aktivasyonun miRNA-204 azalması ile ilişkili bir mekanizma ile gerçekleştiği görülmüştür (2). *PARP-1* DNA tamirinde önemli bir rol almaktadır. *PARP* ailesi 17 proteinden oluşmaktadır. DNA tamiri dışında hücrede transkripsiyonda, replikasyonda, kromatin dinamiklerinde, protein yıkımında, apoptozisde ve birçok hücre faaliyetinde görev almaktadır. *PARP-1* en çok hakkında bilgi sahibi olunan alt grubudur. Reaktif oksijen metabolitleri, alkilleyici ajanlar, radyasyon vb. DNA hasarlayıcı ajanlar sonrasında baz eksizyon onarımı (BER) süreci başlamaktadır. *PARP-1*'in BER'deki rolü tam olarak anlaşılmamış olsa da, en yaygın kabul gören işlevi *PARP-1*'in poli ADP riboz zincirlerinin birikimi sonrasında BER'e katılan proteinleri zincire almasıdır. *PARP-1* aktivasyonu ile DNA'daki kırılmalar algılanır. Bu algılama ile DNA tamir süreci aktiflenmiş olur (55).

2.12. Apelin, kinürenin, endokan

APJ reseptörü ilk olarak G protein reseptörü olarak insan geninden klonlandı. İnsan APJ geni, 377 amino asitten oluşan G-proteini olan yedi transmembran bölgesi reseptörü kodlar ve bu Anjiyotensin II reseptör tip I ile protein düzeyinde %31 oranında birbirine benzemektedir. APJ ligandı 1998'de ilk olarak bulundu ve APLN ismi verildi. Kalp, akciğer, damar yatağı ve birçok damarda APLN ve APJ sentezlenmekteyse de APLN küçük damarların endotelinde daha fazla bulunduğu izlenmiştir. APLN-APJ yolu kardiyak kasılmada ve vasküler tonus oluşumunda görevli olduğu görülmüştür. İki

haftalık APLN infüzyonunun kardiyak kontraktiliteyi arttırdığı görülmüştür. Yine bu yol renin anjiyotensin sistemine karşı bir rol alır. PAH hastalarında endotel hücrelerinde gelişen fonksiyon bozukluğunun APLN-APJ eksenine ile ilişkisini gösteren önemli kanıtlar saptanmıştır. Bu yüzden PAH tedavisinde APLN ile etkili tedavi yöntemlerinin gelişebileceği düşünülmektedir (56).

Triptofan (TRP) katabolizması yakın zamanda otoimmüniteyi azaltarak, bağışıklık azalmasında güçlü bir periferik mekanizması olarak ortaya çıktı. TRP'nin oksidatif parçalanması sonrasında geriye kalan molekülün çoğunu kinürenin oluşturmaktadır. Proinflamatuvar olaylar sonrasında kinürenini parçalayıcı enzimler aktive olmaktadır. Kinürenin yolu kanser, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi durumlarla ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda kinürenin yolunun aktiflenmesi artmış oksidatif stres, inflamasyon, hemostatik bozulma ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda PAH hastalarının plazmasında artmış kinürenin seviyesi saptanmıştır (57).

Endokan ilk olarak 1996 yılında klonlanmış insan umbilikal ven endotelinde çözülebilir dermatan sülfat olarak üretildi. İlk zamanlarda Endotelial hücre spesifik molekül olarak bilinmekteydi. Endokan vasküler proliferasyonda, adhezyon, migrasyonda düzenleyici olarak görev almaktadır. Endokan endotel disfonksiyonunda yeni bir marker olarak düşünülerek yapılan çalışmalarda endokan disregülasyonu sonucunda kanser, diyabetik retinopati, kardiyovasküler hastalıklar, sepsis gelişebileceği gösterilmiştir. MCT ile PAH oluşturulmuş sıçan serumlarında endokan seviyesi yükselmiştir (4).

3.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmada anamnez, fizik muayene, EKG ve ekokardiyografi ile ilk değerlendirme sonrası PH şüphesi olan hastalara sağ kalp kateterizasyonu uygulanmıştır. PH tanısı konulmuş hastaların serumlarından daha önceki çalışmalarda PH ile ilişkisi tespit edilen bazı miRNA, protein düzeyleri ve genetik yolların düzeyleri ölçölerek kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Bu değişimlerin PH gelişimindeki etkileri incelenmiştir.

1. Kan Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

Kan örneklerinden elde edilen çekirdekli kan elemanlarından RNA izolasyonu gerçekleştirilip hem mRNA hem de miRNA için cDNA sentezi yapıldıktan sonra Real-Time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile *HIF-1α*, *PARP-1*, *HIF-2α*, *STAT-3*, *FGF-2*, *FGFR-1* genlerinin mRNA ekspresyonu ve miRNA-210, miRNA-424, miRNA-223, miRNA-204, miRNA-130 miRNA'larının kontrol grubu ve hasta grupları arasındaki ekspresyon değişimi karşılaştırıldı. Elde Edilen örneklerden RNA izolasyonu için Trizol ile total RNA eldesi işlemi gerçekleştirildi. Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirilmesi için çekirdekli kan hücrelerinden RNA izolasyonu Trizol Regant yardımıyla üretici firmanın kit protokolüne göre gerçekleştirildi. Protokol basamakları aşağıdaki gibi yapılmıştır.

1- Öncelikli olarak 2ml kandan, RBC Lizis Buffer (89,9 g NH₄Cl; 10 g KHCO₃, 2 ml 0,5 M EDTA) yardımıyla 25000 rpm de 3 kez santrifüj edilerek çekirdeksiz kan hücreleri patlatılıp çekirdekli kan hücreleri olan akyuvarlar izole edilmiş ve 500μl trizol ile özölüp aşağıdaki Trizol ile RNA izolasyonu protokolü uygulanmıştır.

2- Homojenat 1 ml'lik ependorf tüplere alınmış ve oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmış ardından her bir ependorf tüpe 100 μl kloroform eklenip ve iyice pipetlendikten sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir.

3- Daha sonra +4°C' de 15.000 g'de 20 dk santrifüj edilmiş ve renksiz olan üst faz toplandıktan sonra ayrı ependorf tüplere alınmıştır. Toplanan üst fazın üzerine 500 μl izopropanol eklendikten sonra pipetlenip 10 dk oda sıcaklığında beklenmiştir.

4- +4°C'de 15.000 g'de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dikkatlice atılıp peletin üzerine %70'lik etanol konulmuş ve +4°C'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra tekrar süpernatant atılıp, pellet kısa bir süre hava ile kurutulmuştur.

5- Son olarak pellet 40 µl RNase-DNase free su ile çözülmüştür.

6- Takiben elde edilen RNA'ların miktar ve kalitesi nanodrop cihazı ile tespit edilmiştir. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işleminde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (cihazın ölçebileceği RNA konsantrasyon aralığı 2-3000 ng/µl'dir) sulandırılan RNA örnekleri, 1µl RNase free su ile Nanodrop cihaz kaidesi üzerine bir damla halinde pipetlenip bilgisayardaki program analizi ile kör alındıktan sonra, 1µl olacak şekilde pipetlenip 230, 260,280 nm'de okunmuştur.

Elde edilen örnekler RT-PCR analizi için miRNA, cDNA sentezine hazır hale getirilmiştir.

2. cDNA Sentezi

mRNA ekspresyonu analizi için İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (CatNo: 05 081 955 001, Roche, Almanya) ile oligo d(T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez karışım prosedürü Tablo 6'de verilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra cDNA sentezi için 50°C' de 1 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PCR işlemine kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 6. cDNA Sentez Karışımı

	Hacim	Son konsantrasyon
Total RNA	Değişken	2µg
Oligo(dT) Primer	1µl	2,5 µM
dNTP karışımı (10 mM)	1 µl	500 µM
5X RT tamponu	4 µl	1X
DTT	1 µl	5mM
Protector RNase Inhibitör	0,5 µl	20 U
Easyscript plus RTase (200U/µL)	1 µl	200 ünite
RNAaz içermeyen su	Değişken	-
Son hacim	20 µl	-

Hasta grubu ve kontrol grubuna ait örneklerden miRNA cDNA Synthesis Kit with Poly(A) Polimerase Tailing (abm) ile miRNA cDNA sentezi işlemi gerçekleştirilmiştir. Kit protokolü Tablo 7’de belirtildiği gibidir.

Tablo 7. miRNA cDNA sentez karışımı (abm)

Kit içeriği	Hacim
Total RNA	Değişken
5X Poly(A) Polymerase	2 µl
Reaction Buffer	
ATP (10 mM)	1,5 µl
25 mM MnCl₂	1 µl
Poly(A) Polymerase, Yeast (1U/ µl)	Değişken
RNase-free H₂O	Son hacim 10 µl ye tamamlanır.

Hazırlanan reaksiyon karışımı 37 °C de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Takiben miRNA Oligo (dT) adapter (10 µM) kit komponentinden 2 µl eklenmiştir. Karışım 65 °C de 5 dakika inkübe edilmiş takiben 1 dakika buz üstünde bekletilmiştir. Aşağıdaki komponentler eklenerek senteze devam edilmiştir. (Tablo 8)

Tablo 8. Reaksiyon karışımı

	Hacim
dNTPs	1 µl
5X RT Buffer	4 µl
EasyScript™ RTase (200 U/ µl)	1 µl
RNase-free H₂O	2 µl
Son Hacim	20 µl

Elde edilen total karışım 42 °C de 15 dakika, 70 °C de 10 dakika termal cycleda inkübe edilmiş takiben 4 °C alınmıştır. cDNA sentezini takiben RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmek için miRNA ekspresyonlarının çalışılmasına geçilmiştir.

3. Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı PCR)

Elde edilen cDNA'lar spesifik primerler ile reaksiyona girerek hedeflenen mRNA ve miRNA ekspresyon düzeyi belirlemede kullanılmıştır. Kontrol grubu ve hasta grubu arasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişimi araştırılan genler *HIF-1 α* , *PARP-1*, *HIF-2 α* , *STAT-3*, *FGF-2*, *FGFR-1*'dir. Beta-aktin house-keeping gen olarak kullanılmıştır. Ekspresyon değişimi araştırılacak olan miRNA'lar ise miRNA-210, miRNA-424, miRNA-223, miRNA-204, miRNA-130 olup U6 housekeeping miRNA olarak kullanılmıştır. Ekspresyon değişiminin belirlenmesinde aşağıdaki karışım kullanılmıştır;

Çalışmada kullanılan primerlere ait Reverse ve Forward dizileri Tablo 9' da verilmiştir. Reaksiyon aşamasında, her bir kuyucuk başına "5 μ l SYBR Green" (Applied Biosystem, USA), "6.5 μ l moleküler biyolojik saflıkta su", "1.5 μ l cDNA", "1 μ l Forward Primer" ve "1 μ l Reverse Primer" kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımları 96-kuyucuklu plakaya aktarılmış ve plakanın yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle kapatılmıştır. StepOne Plus RT-PCR cihazına yüklenen plaka, 95^oC'de 10 dk, 40 döngü olacak şekilde 95^oC'de 15 sn ve 60^oC'de 10 dk olacak şekilde amplifiye edilmiştir. miRNA ekspresyonu içinde aynı PCR döngüleri ve oranlar kullanılmıştır.

Tablo 9. Çalışmamızda kullanılan genlerin forward ve reverse primer dizileri

	GEN İSMİ	PRİMER DİZİ
1	Beta-aktin	F:TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC R:CTGCTTGCTGATCCACATCTG
2	<i>HIF-1α</i>	F:TATGAGCCAGAAGAAGCTTTTAGGC R:CACCTCTTTTGGCAAGCATCCTG
3	<i>PARP-1</i>	F:CCAAGCCAGTTCAGGACCTCAT R:GGATCTGCCTTTTGCTCAGCTTC
4	<i>HIF-2α</i>	F:CTGTGTCTGAGAAGAGTAACTTCC R:TTGCCATAGGCTGAGGACTCCT
5	<i>STAT-3</i>	F:CTTTGAGACCGAGGTGTATCACC R:GGTCAGCATGTTGTACCACAGG
6	<i>FGF-2</i>	F:AGCGGCTGTACTGCAAAAACGG R:CCTTTGATAGACACAACCTCCTCTC
7	<i>FGFR-1</i>	F:GCACATCCAGTGGCTAAAGCAC R:AGCACCTCCATCTCTTTGTCGG

✓ PCR Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Verilerin analizi $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılarak bilgisayar programı ile kantitasyonu yapılmıştır. Web tabanlı “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis“ programında bulunan Volcano Plot analizleri kullanılmıştır. Metodun amacı iki ekspresyon sonucunun $\pm 3SD$ karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Böylelikle gen ekspresyonunun karşılaştırılması için yapılan durumlarda kontrol ve doz grubu ilgili genlerin ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlenmiştir. Grupların karşılaştırılması “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” programında bulunan “Student t-testi” analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4. Elisa ile Apelin, Endokan ve Kinürenin Seviyelerinin Belirlenmesi

Kontrol Grubu ve Hasta gruplarında alınan biyokimya tüpündeki kan örnekleri 2500 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek serum eldesi gerçekleştirilmiştir. Çalışma örneklerinin tamamlanmasına kadar elde edilen serumlar -20 °C de muhafaza edilmiştir.

Serum örneklerinden APLN, Endokan, Kinürenin seviyeleri Elisa kit protokolleri uygulanarak tespit edilmiştir. APLN için Human Apelin Elabscience ticari kiti kullanılırken, Kinürenin ve Endokan için Bioassay Technology Laboratory assay kitleri kullanılmıştır. Kit içindeki kimyasalların hazırlanışı, standartların ayarlanması ve kit protokol uygulamaları her bir elisa için aşağıda detaylı olarak anlatılmıştır.

HUMAN APELİN Elisa Prosedür

Kimyasalların hazırlanması

• **Yıkama Tamponu:** 30 ml'lik konsantre yıkama tamponuna 750 ml deiyonize su veya distile su eklenerek 750 ml ye tamamlanmıştır.

• **Standart Solüsyonları:** standart 10.000g de 1 dk santrifüj edilir ve 1ml reference standart diluent koyulur 10 dk beklenir. seri dilüsyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Örneğin APLN: Referans standart 500 pg/mL. Seri dilüsyonlarla

4000 - 2000 – 1000 - 500- 250- 125 – 62.5 – 0 pg/mL

Sample dilüentten 7 ayrı tüpe 500 µl ekle. 500 pg/mL referanstan 250 lik ilk tüpe koyulmuş ve sonra her bir tüpe bir öncekinden 500 µl aktararak seri dilüsyon yapılmıştır.

• **Biotinylated detection Ab working solution:** Stok şişeyi 1x e dilüe ederek kullanılmıştır.

• **Concentrated HRP Conjugate working solution:** Stok şişeyi 1x e dilüe edilerek kullanılmıştır.

1. Çalışmaya başlamadan önce 20 dk kit malzemeler ve örnekler oda sıcaklığına getirilmiştir.

2. 25x yıkama tamponu 1x çalışma solüsyonuna dilüe edilmiştir.

3. Referans standartlar hazırlanmıştır.

4. Çalışmaya başlamadan 15 dk önce, 100x biotinlated detection Ab 1x e dilüe edilmiştir.
5. Çalışmaya başlamadan 15 dk önce, 100x consantarted HRP Conjugate 1x e dilüe edilmiştir.

Elisa Prosedür

1. 50 µl standart veya örnekler kuyuculara koyulmuş ve 50 µl Biotinylated detection Ab. eklenmiştir. 45 dakika 37 °C de inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyondan sonra sıvılar uzaklaştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında aspirasyon ve 3 defa yıkama tamponu ile yıkama işlemi yapılmıştır.
3. 100 µl HRP conjugate eklenip 30 dakika 37 °C de inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon sonrasında aspirasyon ve 5 defa yıkama tamponu ile yıkama işlemi yapılmıştır.
5. 90 µl Substrate reagent eklenip 15 dakika 37 °C de inkübe edilmiştir.
6. 50 µl Stop solüsyonu eklenip 450 nm de mikropilaka okuyucu cihazı (elisa) ile okuma işlemi yapılmıştır.
7. Sonuçlar hesaplanıp ve analiz edilmiştir.

HUMAN Kinürenin Elisa Kit (Bioassay Technology Laboratory)

Kimyasalların hazırlanması

• **Yıkama Tamponu:** 20 ml'lik konsantre yıkama tamponuna 500 ml deiyonize su veya distile su eklenerek 1X e dilüe edilmiştir.

• **Standart Solüsyonları:** 120 µl standart (4800nmol/L) ve 120 µl standart diluent bir tüpe eklenip ve 2400 nmol/L standart stok solüsyonu hazırlanmıştır. (15 dk beklenmiştir)

✓ 2400 nmol/L için: Yukarıdaki 4800 nmol/L'den 120 µl (original standart) + 120 µl standart diluent

✓ 1200 nmol/L için: 2400 nmolden 120 µl + 120 µl standart diluent
4800-2400-1200-600-300-150 nmol/L şeklinde seri dilüsyon yapılmıştır.

• **Biotinylated detection Ab working solution:** Stok şişeyi 1x e dilüe ederek kullanılmıştır.

• **Concentrated HRP Conjugate working solution:** Stok şişeyi 1x e dilüe ederek kullanılmıştır.

Elisa Prosedür

• 50 µl standart veya örnekler kuyuculara koyulmuştur.
• 40 µl örnekler kuyuculara koyulur. 10 µl anti-KYN antibody eklenmiştir.
• Standart ve örneklere 50 µl streptavidin-HRP eklenip (blank hariç), plate kapatılıp 60 dakika 37 °C de inkübe edilmiştir.

• İnkübasyondan sonra sıvılar uzaklaştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında aspirasyon ve 5 defa yıkama tamponu ile yıkama işlemi yapılmıştır.

• 50 µl Substrate solution A ve B eklenmiştir. 10 dakika 37 °C de inkübe edilmiştir.

• 50 µl Stop solüsyonu eklenip 450 nm de mikropilaka okuyucu cihazı (elisa) ile okuma işlemi yapılmıştır.

• Sonuçlar hesaplanıp ve analiz edilmiştir.

HUMAN Endokan (Endothelial Cell Specific molecule 1) Elisa Kit (Bioassay Technology Laboratory)

Kimyasalların hazırlanması

• **Yıkama Tamponu:** 20 ml'lik konsantre yıkama tamponuna 500 ml deiyonize su veya distile su eklenerek 1X e dilüe edilmiştir.

• **Standart Solüsyonları:** 120 µl standart (2400ng/L) ve 120 µl standart diluent bir tüpe eklenir ve 1200 nmol/L standart stok solüsyonu hazırlanmıştır. (15 dk beklenir)

✓ 1200 nmol/L için: Yukarıdaki 4800 ng/L'den 120 µl (original standart) + 120 µl standart diluent

✓ 600 ng/L için: 2400 ng dan 120 µl + 120 µl standart diluent

2400-1200-600-300-150-74 ng/L şeklinde seri dilüsyon yapılmıştır.

• **Biotinylated detection Ab working solution:** Stok şişeyi 1x e dilüe ederek kullanılmıştır.

• **Concentrated HRP Conjugate working solution:** Stok şişeyi 1x e dilüe ederek kullanılmıştır.

Elisa Prosedür

- 50 µl standart veya örnekler kuyuculara koyulmuştur
- 40 µl örnekler kuyuculara koyulur. 10 µl anti-ESM1 antibody eklenmiştir.
- Standart ve örneklere 50 µl streptavidin-HRP eklenmiştir (blank hariç). Plate kapatılıp 60 dakika 37 °C de inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra sıvılar uzaklaştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında aspirasyon ve 5 defa yıkama tamponu ile yıkama işlemi yapılmıştır.
- 50 µl Substrate solution A ve B eklenip 10 dakika 37 °C de inkübe edilmiştir.
- 50 µl Stop solüsyonu eklenip 450 nm de mikropilaka okuyucu cihazı (elisa) ile okuma işlemi yapılmıştır.
- Sonuçlar hesaplanıp analiz edilmiştir.

Gönüllüler İçin Araştırmaya Dahil Olma Kriterleri:

Hasta grubu: Klinik, fizik muayene, ekokardiyografi, sağ kalp kateterizasyonuna göre PH tanısı konulmuş hastalar.

Kontrol grubu: Hasta grubu ile benzer yaş ve cinsiyet özelliklerine sahip sağlıklı kişiler.

Gönüllüler İçin Dışlama Kriterleri:

Hasta grubu: Bilinen sol kalp hastalığı öyküsünün olması (düşük-orta-normal EF li kalp yetmezliği, ciddi mitral ve aort kapak hastalıkları, kardiyomyopati öyküsü), ileri böbrek yetmezliği (eGFR<15 ml/dk), ileri karaciğer yetmezliği, 18 yaş altı ve 80 yaş üstü, bilinen malignite öyküsü olan hastalar çalışma dışında tutulmuştur.

Kontrol grubu: Kronik hastalığı olmayan, sağlıklı ve 18 yaş üstü ve 80 yaş altı kişiler

İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki etki büyüklüğü $d=0,5$ olacak şekilde yapılan güç analizi sonucunda her grup için en az 51 kişi (toplam 102 kişi) alındığında %95 güvenle %80 güç elde edilebileceği hesaplanmıştır. Veriler SPSS paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi, parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Ayrıca sürekli değişkenlerin arasındaki ilişkiler Spearman ya da Pearson korelasyon analizleriyle ve kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar ise Ki-kare analizi ile incelenmiştir.

4.

BULGULAR

4.1. Hasta ve Kontrol gruplarının demografik verileri

Bu çalışmaya PAH tanısı alan 54 hasta ve 55 kontrol grubu dahil edilmiştir. PAH olan grupta yaş ortalaması 59 ± 13 , kontrol grubunda yaş ortalaması 60 ± 11 saptanmıştır. Gruplar arasında yaş ortalaması açısından anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,655$). Hasta grubunun 33'ü kadın (%61,1), 21'i erkek (%38,9), kontrol grubunun 33'ü kadın (%60), 22'si erkek (%40), tüm grupta ise 66'sı kadın (%60,6), 43'ü erkek olarak görülmüştür (%39,4). Gruplar arasında cinsiyet açısından anlamlı fark saptanmamıştır ($p= 0,905$). Hasta grubunda 20 kişinin KTEPH, 6 kişinin konjenital, 7 kişinin skleroderma, 3 kişinin Grup 5 PH ve 1 kişinin RA hastası olduğu görülmüştür.

Tablo 10. Hasta ve Kontrol gruplarının demografik verileri

Cinsiyet				Yaş			
	Kadın	Erkek	p	Ort±S.S	Min	Maks	p
Hasta Grubu	33 (%61,1)	21 (%38,9)	0,905	$62 \pm 13,1$	20	80	0,655
Kontrol Grubu	33 (%60)	22 (%40)		$62 \pm 11,4$	19	77	

4.2. Hasta ve Kontrol gruplarından RT-PCR ile miRNA ve genetik parametrelerin düzeyleri

Kontrol grubunda ölçülen miRNA-210 minimum 10,1, maksimum 36 idi. Hasta

grubunda ise minimum 11,1 maksimum 34,5 idi. Kontrol grubunda 2 örnek, hasta grubunda 9 örnek değeri hesaplanamamıştır. Kontrol grubunda ortalama $22,9 \pm 6,03$, Hasta grubunda ortalama $24,3 \pm 6,8$ idi. Aralarında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,041$).

Kontrol grubunda ölçülen miRNA-130a minimum 10,6, maksimum 32 idi. Hasta grubunda ise minimum 15,7 maksimum 38,4 idi. Kontrol grubunda 2 örnek değeri hesaplanamamıştır. Kontrol grubunda ortalama $22,2 \pm 4,78$, hasta grubunda ortalama $26,1 \pm 4,7$ idi. Aralarında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$).

Kontrol grubunda ölçülen miRNA-204 minimum 4,1, maksimum 37,7 idi. Hasta grubunda ise minimum 10,6 maksimum 34,2 idi. Kontrol grubunda 8 örnek hasta grubunda 5 örnek değeri hesaplanamamıştır. Kontrol grubunda ortalama $24,05 \pm 8,7$, hasta grubunda ortalama $20,6 \pm 6,2$ idi. Aralarında anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,008$)

Kontrol grubunda ve Hasta grubunda ölçülen miRNA-424, miRNA-223 aralarında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,125$, $p=0,055$)

Tablo 11. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen ortalama miRNA düzeyleri ve istatistiksel değerlendirmesi

	Hasta	Kontrol	
	Ort±S.S	Ort±S.S	P
miRNA-130a	26,1± 4,70	22,2 ± 4,78	<0,001
miRNA-204	20,6 ± 6,25	24,05± 8,70	0,008
miRNA-210	24,3 ± 6,83	22,9 ± 6,03	0,041
miRNA-223	21,09 ± 5,98	23,8± 7,09	0,055
miRNA-424	22,9± 5,09	24,3 ± 3,5	0,125

miRNA-210 hasta grubunda 0.05 kat, miRNA-130a 0.06 kat yükselmiştir. miRNA-424 hasta grubunda 2.2 kat, miRNA-223 7.7 kat, miRNA-204 8.4 kat düşük saptanmıştır.

Tablo 12. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen miRNA ekspresyon kat değişimi

	Hastalar ile kontrol grupları arasındaki ekspresyon kat değişimi	
	Kat değişimi	P
miRNA-210	0,0517	0,0519
miRNA-424	-2,2688	0,536
miRNA-223	-7,7327	0,120
miRNA-130a	0,0607	0,223
miRNA-204	-8,4722	0,161

Kontrol grubunda ölçülen *HIF-2 α* minimum 3,3, maksimum 37,6 idi. Hasta grubunda ise minimum 3,07, maksimum 36,5 idi. Hasta grubunda 6 örnek değeri hesaplanamamıştır. Kontrol grubunda ortalama $25,4 \pm 7,9$, hasta grubunda ortalama $29,05 \pm 6,03$ idi. Aralarında anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,007$).

Kontrol grubunda ölçülen *STAT-3* minimum 17,1, maksimum 28 idi. Hasta grubunda ise minimum 16,5, maksimum 29,4 idi. Hasta grubunda 1 örnek değeri hesaplanamamıştır. Kontrol grubunda ortalama $23,1 \pm 2,9$, hasta grubunda ortalama $24,06 \pm 2,7$ idi. Aralarında anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,050$).

Kontrol grubunda ve hasta grubunda ölçülen *HIF-1 α* , *PARP-1*, *FGFR-1* ve *FGF-2* aralarında anlamlı fark saptanmamıştır.

Tablo 13. Hasta ve kontrol gruplarında FGFR-1, FGF-2, HIF-1 α , HIF-2 α , PARP-1, STAT-3 ortalama düzeyleri ve istatistiksel analizi

	Hasta	Kontrol	
	Ort\pmS.S	Ort\pmS.S	P
FGFR-1	28,5 \pm 3,2	28,1 \pm 4,2	0,434
FGF-2	29,5 \pm 2,2	30,3 \pm 1,4	0,064
HIF-1α	23,9 \pm 3,6	23,1 \pm 3,8	0,281
HIF-2α	29,05 \pm 6,03	25,4 \pm 7,9	0,007
PARP-1	22,6 \pm 4,5	22,9 \pm 3,5	0,672
STAT-3	24,06 \pm 2,73	23,1 \pm 2,9	0,050

HIF-1 α ve miRNA-223 arasında negatif yönde zayıf düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0,005).

HIF-2 α ile miRNA-223, miRNA-204 arasında negatif yönde zayıf düzeyde, miRNA-424 arasında pozitif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (p= 0,024, p=0,013, p=0,001).

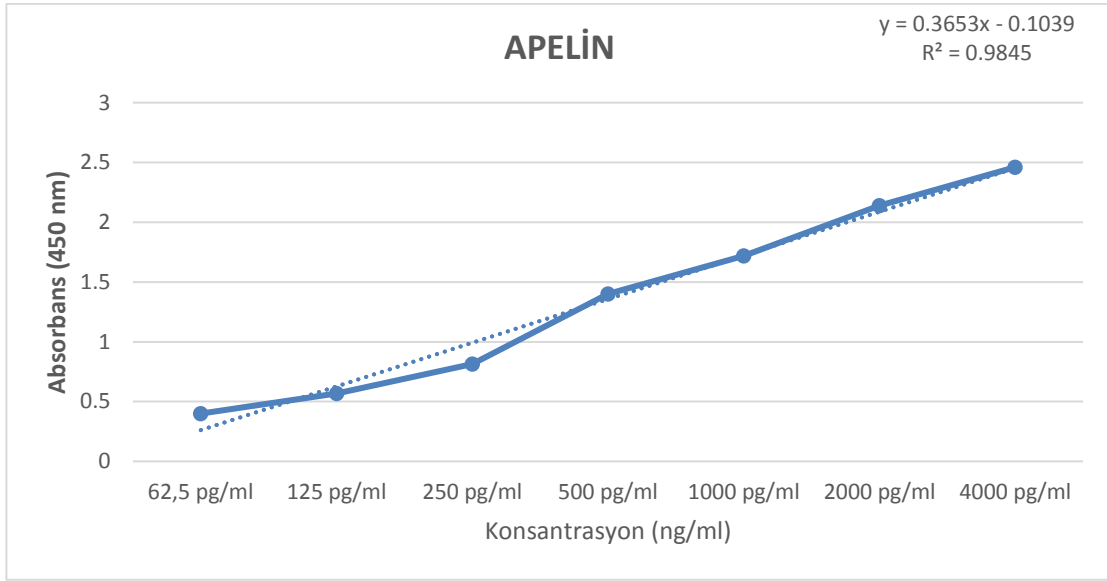
FGF-2 ve miRNA-204 arasında negatif yönde orta düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (p= 0,001).

FGFR-1 ve miRNA-210 arasında negatif yönde zayıf düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (p= 0,042).

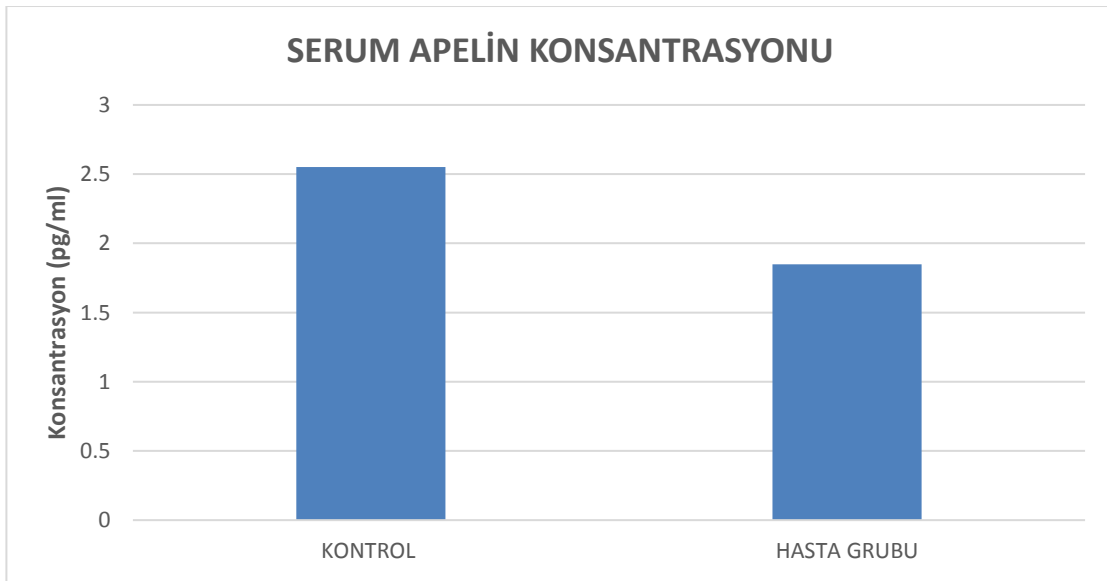
4.3. Hasta ve Kontrol gruplarının serumlarından Elisa ile APLN, Endokan, Kinürenin bakılması

APLN absorpsiyonu kontrol grubunda ortalama 0,082 \pm 0,29, hasta grubunda ortalama 0,57 \pm 0,21 olarak saptanmıştır. APLN konsantrasyonu kontrol grubunda

ortalama $2,55 \pm 0,81$, hasta grubunda ortalama $1,84 \pm 0,57$ olarak saptanmıştır. Aralarında istatistiksel fark saptanmıştır ($p < 0,001$). APLN ile *PARP-1* ve miRNA-424 arasında pozitif yönde zayıf düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır ($p = 0,008$, $p = 0,024$). APLN hasta grubunda 0.7 kat azaldığı saptanmıştır.

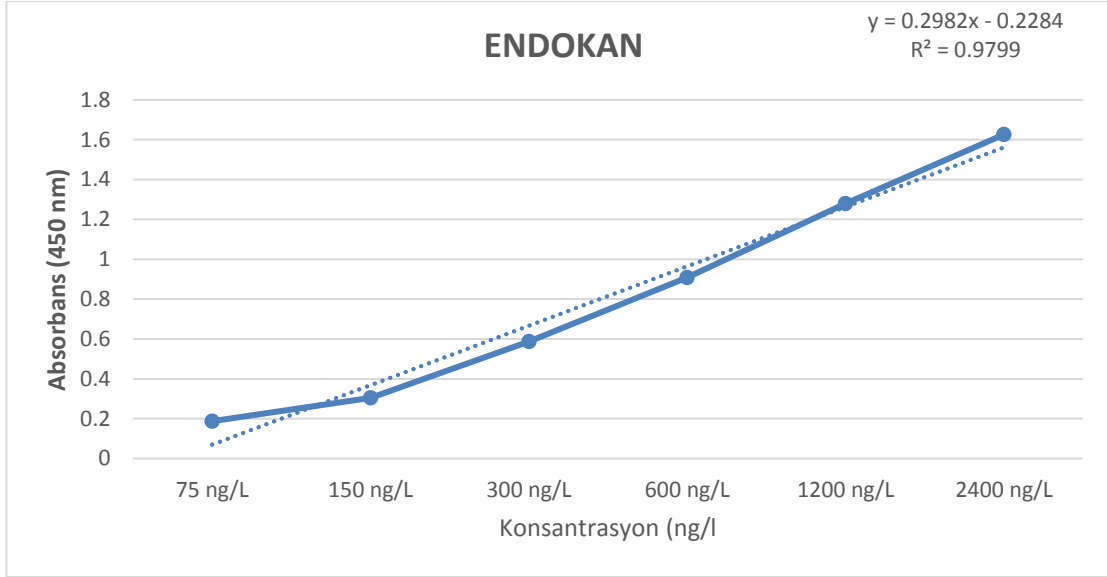


Şekil 2. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen APLN absorbans ve konsantrasyonu

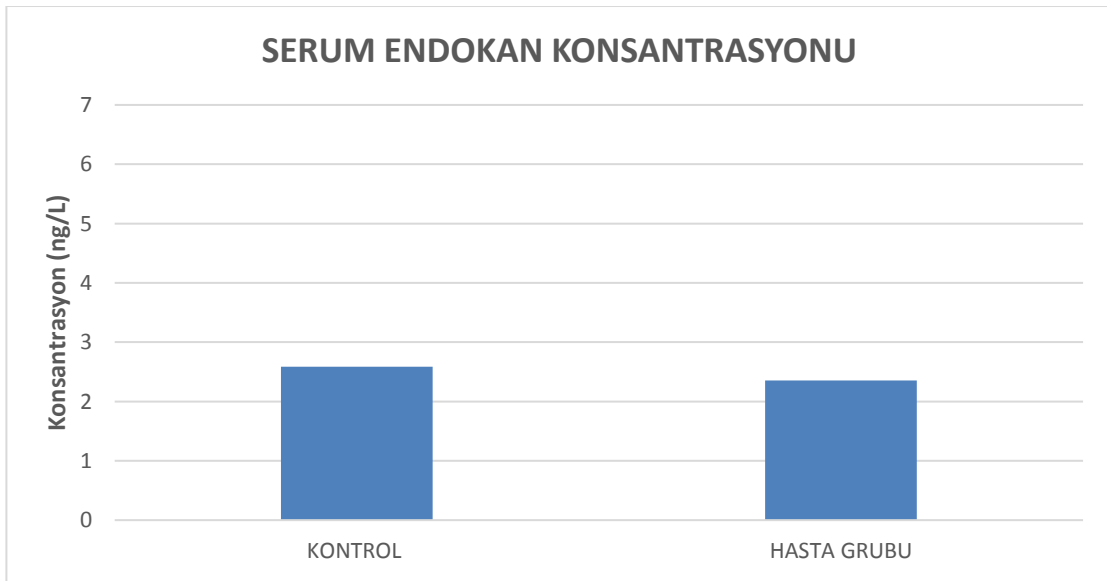


Şekil 3. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen APLN konsantrasyonu

Endokan absorpsiyonu kontrol grubunda ortalama $0,542 \pm 0,63$, hasta grubunda ortalama $0,474 \pm 0,50$ olarak saptanmıştır. Endokan konsantrasyonu kontrol grubunda ortalama $2,58 \pm 2,12$, hasta grubunda ortalama $2,35 \pm 1,68$ olarak saptanmıştır. Aralarında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p = 0,727$). Endokan ile *STAT-3* arasında pozitif yönde zayıf düzeyde, kinurenin arasında pozitif yönde yüksek düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır ($p = 0,034$, $p < 0,001$).

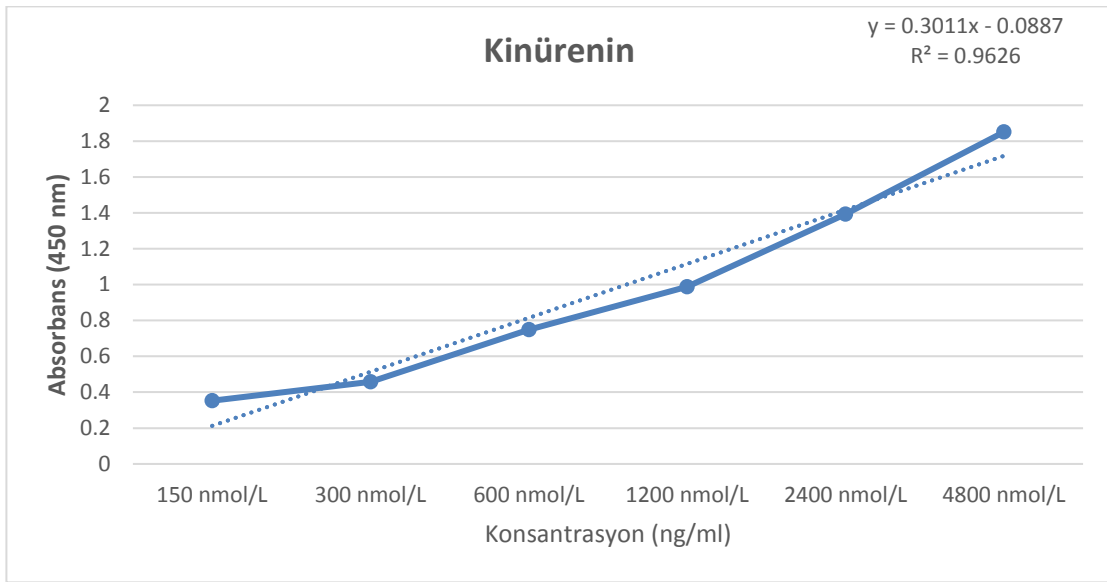


Şekil 4. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen Endokan absorbans ve konsantrasyonu

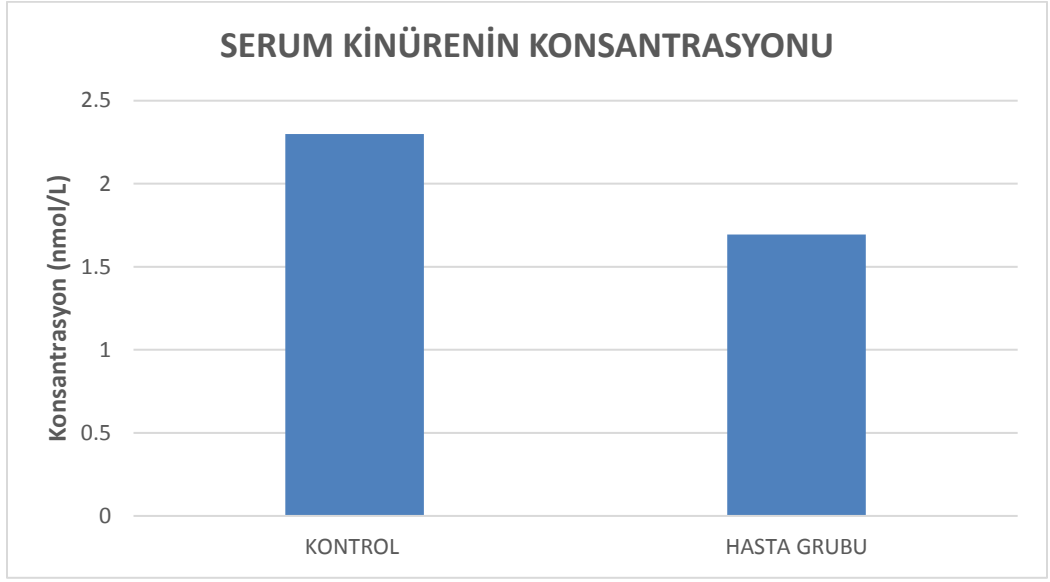


Şekil 5. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen Endokan konsantrasyonu

Kinürenin absorpsiyonu kontrol grubunda ortalama $0,603 \pm 0,61$, hasta grubunda ortalama $0,57 \pm 0,55$ olarak saptanmıştır. Kinürenin konsantrasyonu kontrol grubunda ortalama $2,29 \pm 2,04$, hasta grubunda ortalama $1,69 \pm 1,85$ olarak saptanmıştır. Aralarında istatistiksel fark saptanmıştır ($p=0,001$). Kinürenin ile miRNA-210 arasında pozitif yönde orta düzeyde, miRNA-424, miRNA-130a ve *PARP-1* arasında pozitif yönde zayıf düzeyde, *HIF-2 α* arasında negatif yönde zayıf düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır ($p<0,001$, $p=0,016$, $p=0,012$, $p=0,031$, $p=0,043$).



Şekil 6. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen Kinürenin absorpsiyon ve konsantrasyonu



Şekil 7. Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen Kinürenin konsantrasyonu

4.4. Hasta ve Kontrol gruplarında bakılan parametrelerin birbirleri ile ilişkisi

Tablo 14. Ölçülen örneklerin birbiriyle regresyon analizi

		miRNA-130a	miRNA-204	miRNA-210	miRNA-223	miRNA-424
APLN	r	0,169	-0,025	-0,196	0,012	,309
	p	0,227	0,865	0,160	0,944	0,024
ENDOKAN	r	-0,120	0,228	-0,154	0,133	0,185
	p	0,394	0,124	0,272	0,420	0,185
FGFR-1	r	0,117	-0,132	-,288	0,215	0,131
	p	0,419	0,391	0,042	0,195	0,366
FGF-2	r	0,204	-,452	-0,008	-0,164	0,101
	p	0,143	0,001	0,954	0,319	0,473
HIF-1α	r	0,092	-0,096	0,021	0,114	-0,005
	p	0,526	0,530	0,887	0,502	0,973
HIF-2α	r	0,175	-,357	-0,134	-,359	0,080
	p	0,209	0,014	0,340	0,025	0,570
KİNÜRENİN	r	-0,099	0,234	-0,107	0,306	-0,011
	p	0,482	0,113	0,447	0,058	0,940
PARP-1	r	-0,018	0,161	-0,086	0,199	-0,098
	p	0,901	0,285	0,542	0,231	0,490
STAT-3	r	-0,059	-0,045	0,214	-0,054	0,030
	p	0,674	0,762	0,124	0,743	0,832

5.

TARTIŞMA

PH yüksek mortalite ve morbiditeye neden olan hemodinamik, klinik, histopatolojik özelliklerine göre 5 gruba ayrılan vasküler bir hastalıktır. Grup 1 PAH klinik özelliklerin eşlik ettiği hastalarda OPAB >20 mmHg, PAWP ≤15, PVR ≥3 ölçülmesi ile tanımlanmaktadır. Yaygın vasküler inflamasyonun gözlendiği bu subtipte altta yatan birçok sebep bu duruma yol açabilmektedir. Grup 1 PAH yüksek derecede aktiflenmiş inflamatuvar sitokinler ve kemokinlerin perivasküler immün hücreler ile etkileşimi sonrasında hastalık ilerlemektedir (58). PAH'de birçok hücre grubunun etkileşimi ile biyokimyasal ve hücresel değişikliklerin geliştiği bilinmekle birlikte patolojik değişikliklerin başlama sebebi tam olarak bilinmemektedir. PVR yükselmesi, vazokonstriksiyon, pulmoner arter duvarının proliferasyonu ve tıkanmaya ilerleyen yeniden şekillenmesi, inflamasyon ve trombus ile ilişkilidir. İleri damar daralması PASCM'deki potasyum kanallarının aşırı aktiflenmesi ve endotel disfonksiyonu ile ilişkilidir. Endotel disfonksiyonu vazodilatör ajanlar olan NO ve prostosiklin salınımının azalmasına yol açarken proliferatif ajanlar olan tromboxan A2, endotelin 1 artışına da yol açmaktadır. Bunun sonucunda damar daralması ve proliferasyon artışı öncelikli olarak PAEC, PASMC ve fibroblast ile ilişkilidir. Bunun yanında adventisyada kolojen, elastin, fibronektin, tenaskin, inflamatuvar hücre, trombosit aşırı üretimi de izlenmektedir. Trombus gelişimine yatkınlık olup distal ve proksimal elastik pulmoner arterlerde trombus izlenmekle beraber patolojik değişiklikler damar çapı <500 µm distal pulmoner arterlerde belirgindir. Distal pulmoner arterlerde karakteristik olarak mediyal hipertrofi, intimal proliferasyon artışı, ekzantrik ve konsantrik fibrotik değişiklikler, adventisyal kalınlaşma ile beraber perivasküler inflamatuvar hücre artışı kompleks plexiform ve dilate lezyonlar ile trombotik lezyonlar görülmektedir. Pulmoner venlerin etkilenmemesi tipiktir (36).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda birkaç miRNA'nın bu hastalığın patofizyolojik gelişiminde direkt rol aldığı saptanmıştır. İnsan genomunda şuana kadar 5500 adet hücre içi, küçük, kendi başına kodlayıcı olmayan miRNA tanımlanmıştır. Primer ve prematür miRNA'lar çekirdek ve sitoplazmada bir dizi işlem sonrasında

olgunlaşmaktadır. Bu matür miRNA'lar 19-24 nükleotit uzunluğunda olup çift zincirli RNA molekülleridir. Bu miRNA moleküllerinde 6 nükleotitlik bölümü bağlanılacak mRNA bölgesini belirlemektedir. Bu bağlı mRNA-miRNA'lar transkriptom boyunca spesifik nükleik asitlerin birbirine bağlanmasını gen ekspresyonu ile düzenleyip, transkripsiyon yıkımını ya da protein translasyonunu engeller. PAH hastalarında miRNA düzeylerinde dinamik değişikliklerin patolojik değişikliklerle ilişkilendirilmesi, miRNA'ların tanısallık ve prognostik önemi olabileceğini düşündürmektedir. PAH hastalarının plazmalarında dolaşan miRNA düzeyleri hastalık düzeyini yansıtabilir (2)(58).

Daha önceden yapılan çalışmalarda miRNA aracılığıyla genetik yollardaki değişikliklerin PAH ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Biz de daha önceki çalışmalarda tespit edilen PAH ile ilişkisi saptanmış miRNA'ları belirledik. Prekapiller PH saptanan 54 hasta ile yaş ve cinsiyet açısından uyumlu 55 sağlıklı kişinin kanlarından miRNA-130a, miRNA-204, miRNA-210, miRNA-223, miRNA-424, *HIF-1α*, *HIF-2α*, *FGF-2*, *FGFR-1*, *PARP-1*, *STAT-3* düzeylerine baktık. Ayrıca yine hasta ve kontrol gruplarının kanlarında APLN, endokan, kinürenin düzeylerine bu hastaların tanı ve takibinde kullanılabileceği düşüncesiyle baktık.

Bizim çalışmamıza katılan hastaların yaş ortalaması 59 ± 13 iken Türkiye'de yapılan 20 merkezli 1501 PH hastasından oluşan SIMURG kayıt çalışmasında ise yaş ortalaması $44,8 \pm 5,5$ idi. SIMURG çalışmasında kadın hastaların oranı %69 iken, bizim çalışmamızda %61,1 idi. Grup 1 PH'nin sıklığı SIMURG çalışmasında %69 iken bizim çalışmamızdaki hastaların %57'si grup 1 PH idi. Yine SIMURG çalışmasında tanı anında çalışmanın PH popülasyonunun %18, %52, %27 ve %3'ü sırasıyla WHO FK IV, III, II ve I olan hastalar oluşturur iken bizim çalışmamızda da tanı anında PH popülasyonunun %13, %47, %34 ve %5'i sırasıyla WHO FK IV, III, II ve I olan hastalar oluşturdu (59).

Youpeng Jin ve ark. yaptığı çalışmada %1 oksijene maruz kalan kültüre insan PASC' de 48 saat içinde miRNA-210 düzeylerinde 2.5 kat yükselme görmüşlerdi. Hipoksiye bağlı olarak miRNA-210 yükselmesini akut hipoksik stres sırasında mitokondri içinde demir-kükürt kompleksinin azalması ile ilişkili olduğunu

göstermişlerdi. Farelerde Mitojen ile aktive olan protein kinaz fosfataz 1 (MKP-1) eksikliğini ciddi PH gelişimine yol açtığı daha önceden gösterildiği için Youpeng Jin ve ark. miRNA-210 ile MKP-1 etkileşimini ve bu etkileşimin PASMCM'deki proliferasyon üzerine etkisini incelemişler, hipoksik ortamda miRNA-210 artışını gözlemledikten sonra miRNA-210 inhibisyonu ile MPK-1 artışını tespit etmişlerdir. Bu artış sonrasında hücrel proliferasyon gerilemiştir (60). Biz de miRNA-210 ekspresyon seviyesinin hasta grubunda 0.05 kat yüksek saptadık ve bunu istatistiksel olarak anlamlı bulduk ($p=0,041$). Bu yüzden miRNA-210 artışının PH ile ilişki olduğunu düşünüyoruz.

Yang Lu ve ark. yaptıkları 200 sıçanlık bir çalışmada hipoksi ile PH oluşturulan sıçan PASMCM'lerinde aktiflenen mitoKATP'nin *HIF*'i aktive edebilen ROS üretimini arttırdığını göstermişlerdir. ROS artışı ile, ROS / *HIF* / miRNA-210 / ISCU sinyal yolu açılarak yüksek bir miRNA-210 ekspresyonunu indüklemiş ve sıçan PASMCM'lerin çoğalmasını uyaran pozitif bir geri besleme döngüsü oluşturduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada hipoksi ile PH oluşturulan sıçan PASMCM'lerinde anti-miRNA-210 verilerek oluşan hücrel şekillenmenin geri döndürüldüğü görülmüştür (61). Deming Gou ve ark. yaptığı çalışmada kültüre insan PASMCM'lerde hipoksi ile PH oluşturmuş ve bu insan PASMCM'lerinde 1265 miRNA içinden 5 miRNA düzeyinin arttığı ve artan miRNA'lar içinde dominant miRNA'ı miRNA-210 olarak tespit etmişlerdir (62). Biz de çalışmamızda kan hücrelerinden RNA izolasyonu ile miRNA-210 düzeylerine bakarak PH hastalarında düzeylerinin arttığını gördük. Bu nedenle PH patogeneğinde miRNA-210 etkisinin olduğunu kuvvetli bir şekilde düşünmekteyiz. Ancak Yang Lu ve ark. saptadıkları *HIF* ile miRNA-210 arasındaki pozitif ilişki bizim çalışmamızda saptanmamıştır. Biz *HIF-2 α* ile miRNA-210 arasında negatif yönde zayıf korelasyon görürken, *HIF-1 α* ile miRNA-210 arasında bir ilişki saptanmamıştır. Yang Lu ve ark. yaptığı çalışmada hipoksi ile PH oluşturulan sıçan PASMCM'de değişikliklerin incelemiş iken biz çalışmamızda hasta insanların kanlarında oluşan değişiklikleri inceledik. Ayrıca bizim çalışmamızdaki hastalar, sadece hipoksi ile oluşturulmuş PH hastaları değildir. Bu nedenle miRNA-210 ile *HIF* arasındaki ilişki hipoksi ile belirginleşmekte olabilir.

Malgorzata Jasiewicz ve ark. triptofan ve kinüenin plazma korelasyonlarının PAH'da yüksek olduğunu ve PAH hastalarında kinüenin yıkımının azaldığını

göstermişlerdir (57). Bizim çalışmamızda da kinurenin ile miRNA-210 arasında pozitif yönde orta düzeyde bir ilişki izlenmiştir. Bu ortaya çıkan sonuç sonrasında PH hastalarında miRNA-210 artışının kinurenin artışına yol açabileceğini bizlere düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda ayrıca *FGFR-1* ve miRNA-210 arasında negatif yönde zayıf düzeyde bir ilişki saptadık. Ancak bu ilişki daha önceden belirtilmemiş olup zayıf düzeyde olması nedeniyle bu konuda ileri incelemeler gerekmektedir.

Thomas Bertero ve ark. yaptıkları çalışmada miRNA-130/301'in peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör (PPAR) üzerinden direkt vazomotor tonusu etkilediğini dahası vasküler proliferasyonu hücreler arası etkileşimi sağlayarak arttırdıklarını tespit ettiler. Ayrıca EDN1'in miRNA-130/301 tarafından upregüle edilerek *STAT-3* aktivasyonuna neden olduğu bunun da PASMC'de vazokonstriksiyona neden olduğunu gösterdiler. Bu nedenle miRNA-130/301 ailesinin PH patogenezinde önemli bir yeri olduğunu saptadılar (63). Yine Thomas Bertero ve ark. başka bir çalışmada PH oluşturulmuş farelerde miRNA-130/301'in miRNA-204, miRNA-424/503, *FGF-2* ve *STAT-3* düzeylerini yönlendirdiği buldular (3). Matthias Brock ve ark. hipoksi ile PH oluşturulmuş farelerde majör miRNA ailesinin miRNA-130 olduğunu, düzeyinin arttığını ve bunun tümör baskılayıcı CDKN1A (p21)'i hedef alarak fare PASMC'de proliferasyonu düzenlediklerini tespit ettiler (64). Bizim çalışmamızda da benzer olarak hasta gruplarının kanlarından ölçümü yapılan miRNA-130a ekspresyon seviyesi hasta grubunda 0.06 kat yükselmiştir ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$). Bu da PH hastalarında miRNA-130a'nın PH patogenezinde önemli bir rolü olduğunu bizlere düşündürmektedir.

Roxane Paulin ve ark. miRNA'ların PAH'daki ilişkisini araştırdılar. *Src/STAT-3/Pim1* aksının PAH patogenezinde kritik rolü olduğunu saptadılar. Dahası miRNA-204 azalmasının *STAT-3* artmasına yol açtığı izlediler (65). Biz de benzer şekilde hastalarda miRNA-204 düzeylerini azalmış olarak tespit ettik. Hatta ölçülen miRNA-204 ekspresyon seviyesi hasta grubunda kontrol grubuna göre plazmada 8.4 kat düşük olarak saptadık. Bu da bu hastalarda miRNA-204'ün tanı sırasında plazmadan düzeylerinin ölçülebileceğini düşündürmektedir.

Jolyane Meloche ve ark. *PARP-1* salınımının DNA hasarı ile ilişkili olduğunu

buldular. PARP-1 aktivasyonu ile başlayan hücrel proliferasyon miRNA-204 azalması, NFAT ve *HIF-1 α* artması ve bunun sonucunda PASMC'de proliferasyon ve apoptozis azalmasına yol açtığını gösterdiler. Bu yüzden *PARP-1* inhibitörünün PAH hastalarında tedavide kullanılabilceği düşüncesi üzerine hem in vitro hem de iki geniş in vivo çalışmada PAH'da gelişen değişikliklerin *PARP-1* inhibitörü ile geri döndürüldüğü gösterilmiştir (66). Ancak bizim çalışmamızda miRNA-204 ile *PARP-1* arasında anlamlı klinik bir ilişki saptanmadığı için bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır ve hücrel düzeyde artış gösteren *PARP-1*'in kan düzeyinde artmadığını söyleyebiliriz.

Raed Alhawaj ve ark. 21 gün boyunca hipoksi (%10 oksijen) ile PH oluşturulan fareler ile hipoksiye 24 saat maruz kalan organoid sığır pulmoner arterlerinde, *STAT-3* aracılı miRNA-204 düzeyindeki değişiklikleri, hem biyosentez modülasyonunda rol alan aminolevulinik asit (ALA)'ın koruyucu etkisini ve süperoksit düzeylerinin ölçülmesini planladılar. ALA'nın azalmasının tespit edilmesinden sonra ALA ile tedavi edilen farelerde pulmoner arterlerde süperoksit azalması sonrasında fare akciğerlerinde miRNA-204'ün artmış olduğunu gösterdiler. Tedavi sonrasında EKO ile fareler değerlendirilerek PH'deki gerilemeyi tespit ettiler. Yine ALA tedavisi sonrasında sığır pulmoner arterinde artan miRNA-204 düzeylerini gösterdiler. miRNA-204 artması sonrasında *STAT-3* etkisinin azalarak proliferasyonun azaldığını ve böylece ALA tedavisi ile miRNA-204 ifadesinin tekrar düzenlenmesi ile potansiyel olarak artan mitokondriyal süperoksit ve oksidan etkilerinin tersine çevrilmesinin mümkün olacağını belirttiler (67). Biz çalışmamızda ALA etkisini değerlendirmedik. Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarının bakılan *STAT-3* değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki tespit ettik ve *STAT-3* düzeyinin serumdan prekapiller PH hastalarında ölçülebileceğini ve patogenezi ile ilişkisi olduğunu düşünmekteyiz.

Leonard E. Estephan ve ark. 91 WHO grup 1 ve grup 2 ve non PH hastaların sağ atrium, vena cava superior, pulmoner arter, pulmoner kapiller kama bölgelerinden kan örnekleri aldılar. Periferik kandan mononükleer hücreler izole ederek miRNA-204'ün PASMC'den salınımını in vitro olarak değerlendirdiler. Sadece grup 1 hastalarında miRNA-204 korelasyonunun pulmoner damar boyunca arttığını tespit ettiler. Periferik mononükleer hücre grupları arasında anlamsız miRNA-204 varyasyonları tespit ettiler.

Kontrol hastalarına göre kültürlenmiş PAH-PAMSC'de miRNA-204 hücre içi azalmış olduğunu gösterdiler. miRNA-204'ün PH'de bilinen önemi göz önüne alındığında, Grup 1 PAH'da hücre içi miRNA-204 konsantrasyonunun azalmasına neden olabileceğini gösterdiler (58). Biz de çalışmamızda benzer şekilde miRNA-204 konsantrasyonu plazmada azalmış olarak izledik.

Audrey Courboulin ve ark. yaptığı çalışmada PAH'da miRNA-204 ekspresyonunun insan ve kemirgen PSMC'de azaldığını saptadılar. PSMC'lerde miRNA-204 azalma seviyesinin PAH ciddiyeti, hücre proliferasyonu ve hücrelerdeki antiapoptotik düzey ile ilişkili olabileceğini gösterdiler. Bu hücrelerde *STAT-3* aktivasyonu sonrasında miRNA-204 seviyesinin azaldığı ve miRNA-204'ün SHP2 ekspresyonunu hedeflediğini ortaya çıkardılar. *STAT-3* aktivasyonu sonrasında hücrelerde proliferasyon ve antiapoptozisin devam ettiğini gösterdiler. Ve hayvan modellerinde azalan miRNA düzeyi için sentetik miRNA-204 verilmesi PAH ciddiyetini geriletmediğini gösterdiler (68). miRNA-204 ile yapılan bütün bu çalışmaların ve bizim yaptığımız bu çalışma sonrasında PH hastalarında miRNA-204 plazmada azalmaktadır ve bu azalma PH gelişiminde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

Ayrıca bizim çalışmamızda *HIF-2 α* ile miRNA-204 arasında negatif yönde zayıf düzeyde; *FGF-2* ve miRNA-204 arasında negatif yönde orta düzeyde bir ilişki izlenmiş olup daha önceden literatürde benzer bir sonuç rapor edilmemiştir. Bu ilişkiler PAH hastalarında hücre proliferasyonu ile ilgili olabilirler. Bu konunun ileri incelemelerle tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir.

Yan Zeng ve ark. yaptığı çalışmada hipoksi ile PH oluşturulmuş fare ve sıçan akciğer, pulmoner arter, PSMC'lerinde miRNA-223 düzeylerinin azaldığını tespit ettiler. Ayrıca konjenital PAH'lı kadınların serumlarında da miRNA-223 azaldığını tespit ettiler (69). Igor B. Gubrij ve ark. yaptığı çalışmada MCT ile PAH oluşturulan sıçanlarda kontrol grubu ile kıyaslanınca miRNA-17, miRNA-21 ve miRNA-223 ekspresyon seviyelerinin arttığı, miRNA-126, miRNA-145, miRNA-150, miRNA-204, miRNA-424 ve miRNA-503 ekspresyon seviyelerinin ise azaldığını tespit ettiler (70). Benzer şekilde biz de miRNA-223'ün ekspresyon seviyelerinde hastaların plazmalarında 7.7 kat azalma saptadık. Bu sonuçlar da miRNA-223'ün PAH ile ilişkisi olduğunu bize

göstermekle beraber PAH hastalarının kanlarından RNA izole edilerek miRNA-223 düzeyinin ölçülmesi ile hastalık tanı ve tedavisinin geliştirilebileceğini düşündürmektedir. Bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Jolyane Meloche ve ark. insan PAH akciğerlerinde, distal pulmoner arterlerde ve izole PASMCM'lerde miRNA-223 seviyesinin azaldığını gösterdiler. Ayrıca bu hastalarda *HIF-1α*'nın arttığını ve *HIF-1α* artışının miRNA-223 azalmasını tetiklediğini gözlemlədiler. Devamında miRNA-223 azalması ile tespit ettikleri artan *PARP* düzeyi sonucunda PASMCM'de proliferasyon artışı ve apoptozisin gerilemesi ile ilişkisini tespit ettiler. Bunun üzerine sıçanlarda MCT ile PAH oluşturulması sonrasında artan miRNA-223 seviyesinin düzenlenmesi ile vasküler şekillenme, pulmoner direnç, sağ ventriküler hipertrofi ve hayatta kalma üzerine yararlı etkileri olduğunu tespit ettiler (71). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde *HIF-1α* ve miRNA-223 arasında negatif yönde zayıf düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Bu da bize miRNA-223'ün azalmasının *HIF-1α* artışına yol açarak PAH patogeneğinde önemli bir yeri olabileceğini düşündürmektedir. Fakat bizim çalışmamızda miRNA-223 ile *PARP* arasında hasta ve kontrol gruplarının plazmasından bakılan ölçümlerde anlamlı farklılık izlenmedi. Bu farklılık hücresel düzeyde *PARP* artışı olabileceği ancak bunun plazma düzeyinde saptanamayabileceğini bizlere düşündürmektedir.

Fukao T ve ark. yaptıkları çalışmada CCAAT/enhancer binding protein-a'nın (C/EBPa) çekirdekte miRNA-223 promoter bölgesine bağlanarak miRNA-223 aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Seifeddine R. ve ark. yaptıkları çalışmada ise C/EBPa düzeyinin *HIF-1α* ile ilişkisini fare akciğerlerinde ve COS-7 hücrelerinde yapılan çalışmalar ile göstermişlerdir. Benzer ilişki *HIF-2α* ile de görülmüştür(72). Bizim çalışmamızda da *HIF-2α* ile miRNA-223 arasında negatif yönde zayıf düzeyde bir ilişki saptanmış olup PAH hastalarında miRNA-223 ile *HIF-1α* ve *HIF-2α* ilişkisi olduğunu düşünmekteyiz. Ancak bu ilişki zayıf düzeyde olup ileri inceleme gerektirmektedir.

Jongmin Kim ve ark. yaptıkları çalışmada PAH ile ilişkisi gösterilmiş APLN ve *FGF-2*'nin birbiri ile ilişkisini değerlendirilmişlerdir. Bu çalışmada APLN sinyalinin PAEC'de azalması, *FGF-2* ve *FGFR-1* artışı ile sonuçlanmıştır. APLN azalması

sonrasında miRNA-424 ve miRNA-503 azalması gözlenmiştir. Bu değişimlerin sonucunda PAEC ve PASMCM'de proliferasyon arttığı gözlenmiştir. miRNA-424 ve miRNA-503 düzeylerinin restorasyonu ile *FGF-2* ve *FGFR-1*'in azaldığı ve patolojik değişimlerin gerilediği ortaya çıkmıştır (73). Bizim çalışmamızda kontrol grubunda ve hasta grubunda ölçülen miRNA-424 aralarında anlamlı fark saptanmasa da hasta grubunun plazmasında benzer şekilde azalma vardır. Hastaların plazmasında kontrol grubuna göre miRNA-424'ü 2.2 kat düşük saptadık. APLN ile miRNA-424 arasında pozitif yönde zayıf düzeyde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Bu da APLN ile miRNA-424 arasındaki bir ilişkinin olabileceğini düşündürmekle beraber bu konuda ileri incelemeler gerekmektedir..

Jongmin Kim yayınladığı derlemede hücrelerde bulunan G protein ile birleşen APLN reseptörünün, Krüppel-benzeri faktör 2, endotelial nitrik oksit sentetaz ve miRNA'lar gibi araçlar ile pulmoner vasküler hemostazda önemli rolü olduğu açıklamış ve bu yolun kesintiye uğramasının PAH gelişiminde majör bir rolü olduğunu belirtmiştir. Bu nedenle PAH tedavisinde APLN üzerinden tedavi rejimlerinin denenmesi gerektiğini belirtmiştir (56). Bizim çalışmamızda APLN hasta grubunda 0.7 kat azalmıştır. Bu azalma tarafımızca yapılan istatistiksel analiz sonrasında anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Bu da hastalıkla APLN düzeyindeki azalmanın serumdan tespit edilebileceğini ve bu tespit ile hastaların tedavi ya da tanı rejimlerinin düzenlenebileceğini düşündürmektedir.

Peiran Yang ve ark. yaptığı çalışmada MCT ile oluşturulan PH'de MM07 adlı APLN reseptör agonistinin önemli bir şekilde sağ ventriküler basıncı ve hipertrofiyi azalttığını göstermiştir. MM07 aynı zamanda pulmoner arterlerde kas gelişimini de azaltmıştır. Bu data APLN reseptör agonistlerinin farmakokinetik profillerinin düzeltilmesi ile PAH'da kullanılabileceğini göstermektedir (74).

Çalışmamızda DNA hasarı ile ilişkisi bilinen *PARP-1* ile APLN arasında pozitif yönde zayıf düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p = 0,008$). Bu bulgu literatürde daha önceden tespit edilmemiştir ve APLN'nin PH hastalarında DNA hasarında da rol alabileceğini düşündürmektedir.

Haiyan Zhao ve ark. yaptığı bir çalışmada endokanın endotel disfonksiyonunda

yeni bir belirteç olarak kullanılabileceği belirtmiştir. Yapılan bu çalışmada sıçanların serum ve akciğerlerinde endokanın arttığı tespit edilmiştir. Artmış olan Endokanın inhibe edilmesi ile sıçanların akciğerlerinde sağ ventrikül sistolik basıncının, pulmoner yeniden şekillenmenin ve inflamasyonun azaldığı gösterilmiştir. Sıçan pulmoner mikrovasküler endotel hücrelerinde *TNF- α* artışı ile endokan salınımının arttığı gösterilmiştir. Endokan inhibisyonu sonrasında *TNF- α* 'nın indüklediği MAPK aktivasyonunda azalma gösterilmiştir (75). Bizim çalışmamızda endokan hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da benzer şekilde hastaların plazmalarında kontrol grubuna göre 0.91 kat azalmıştır. Endokanın hücre hasarı ile ilişkili olabileceği düşünmekle beraber bu konuda yeni çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Asiye Kanbay ve ark. 128 obstrüktif uyku apne (OSA) hastasını değerlendirdikleri bir çalışmada (15 kontrol, 22 hafif, 22 orta düzeyde ve 69 ciddi OSA) endokan seviyelerini bu hasta grubunda yükselmiş olarak buldular. Ve serum endokan düzeyinin OSA hastalık ciddiyeti ve endotel disfonksiyonu ile güçlü bir ilişkisi olduğunu gösterdiler (76). Bu bulgular doğrultusunda PH hastalarının plazmasında azalan endokan düzeylerinin hastalıkla ilişkisi olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca bizim çalışmamızda endokan ile *STAT-3* arasında pozitif yönde zayıf düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0,034$) ve bu bulgu literatürde yeni bir bilgi olup ileri çalışmalarla değerlendirilmelidir.

Corrado Campochiaro ve ark. sistemik skleroz hastalarının serumlarında triptofan metaboliti olan kinürenin seviyesi ile triptofan/kinürenin oranını değerlendirdiler. Bu hastalarda triptofan seviyesinin kontrollere göre oldukça düşük olduğunu tespit ettiler. Bu sonuçlar bu hastaların serumlarında kinürenin yüksek seviyesi ile paraleldi (77). Yine Malgorzata Jasiewicz ve ark. triptofan ve kinürenin plazma korelasyonlarının PAH'da yüksek olduğunu gösterdiler (57). PAH hastalarında kinürenin yıkımının azaldığı gösterildi. Bizim çalışmamızda kinürenin hasta grubunda 0.73 kat azalmıştır ve bu azalma kontrol ve hasta grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,001$). PAH hastalarında serumda bakılan kinürenin ile hastalığın ilişkisi diğer çalışmalarla tekrardan değerlendirilmelidir.

6. ÇALIŞMANIN KISITLILIKLARI

Çalışmada prekapiller PH hastaları öncelikli olarak değerlendirilmeye çalışılsa da kombine pre-post kapiller PH hastaları da çalışmaya dahil edilmiştir. Yapılan inceleme, dokudan hücresel düzeyde yapılmamış olup hastaların plazma örneklerinden yapılmıştır ve hücresel düzeyde değişikliklerle tekrar değerlendirilmelidir. Yaptığımız bu çalışma tek merkezli bir çalışma olup bu hasta grubunda benzer sonuçların daha geniş çaplı çalışmalar ile değerlendirilmesi gerekmektedir.

7.

SONUÇ VE ÖNERİLER

PH hastalarının plazmalarında *HIF-2 α* ve *STAT-3*'ün mRNA ekspresyonlarında miRNA-210 ve miRNA-130a ekspresyonlarında artış saptanırken; miRNA-204 ekspresyonunda azalma ile APLN ve kinürenin konsantrasyonlarında azalma izlendi. Çalışma bulgularımız, miRNA-210, miRNA-130a, *HIF-2 α* ve *STAT-3* inhibisyonunu; APLN, kinürene, miRNA-204 konsantrasyonlarını arttırmayı hedef alan yeni terapötik rejimlerin geliştirilmesi gerektiğini göstermiştir. Aynı zamanda prekapiller PH hastalarında APLN-miRNA-424, *FGFR-1*-miRNA-210, *FGF-2*-miRNA-204, *HIF-2 α* -miRNA-204 ve *HIF-2 α* -miRNA-223 arasında daha önceden belirtilmeyen bir ilişki tespit ettik.

8. KAYNAKLAR

1. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med.* 1987; Aug;107(2):216-23.
2. Chun HJ, Bonnet S, Chan SY. Translational advances in the field of pulmonary hypertension: Translating MicroRNA biology in pulmonary hypertension: It will take more than “miR” words. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;Jan 15;195(2):167-178
3. Bertero T, Lu Y, Annis S, Hale A, Bhat B, Saggari R, et al. Systems-level regulation of MicroRNA networks by miR-130/301 promotes pulmonary hypertension. *J Clin Invest.* 2014;124(8):3514–28.
4. Zhao H, Xue Y, Guo Y, Sun Y, Liu D, Wang X. Inhibition of endocan attenuates monocrotaline-induced connective tissue disease related pulmonary arterial hypertension. *Int Immunopharmacol [Internet].* 2017;42:115–21.
5. Schlosser K, Taha M, Deng Y, Jiang B, Stewart DJ. Discordant regulation of microRNA between multiple experimental models and human pulmonary hypertension. *Chest.* 2015; Aug;148(2):481-490.
6. Nagy BM, Nagaraj C, Meinitzer A, Sharma N, Papp R, Foris V, et al. Importance of kynurenine in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 2017; Nov 1;313(5):L741-L751
7. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2019;Jan 24;53(1)
8. Subias PE. Comments on the 2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *Rev Esp Cardiol.* 2016;69(2):102–8.
9. McLaughlin V V., Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, et al. ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension. *Circulation.* 2009;Apr 28;119(16):2250-94
10. Olschewski HO, Hoeper MM, Borst MM, Ewert R, Grünig E, Kleber X, et al. Diagnosis and Therapy of Chronic Pulmonary Hypertension. *Pneumologie.* 2006; 301–330
11. Abman SH, Hansmann G, Archer SL, Ivy DD, Adatia I, Chung WK, et al. Pediatric pulmonary hypertension. *Circulation.* 2015;132(21):2037–99.

12. Chin KM, Kim NHS, Rubin LJ. The right ventricle in pulmonary hypertension. *Coronary Artery Disease*. 2005;Feb;16(1):13-8.
13. Hopkins WE. The remarkable right ventricle of patients with Eisenmenger syndrome. *Coronary Artery Disease*. 2005; Feb;16(1):19-25.
14. Önder Öztürk, Ünal Şahin. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon: Tanı Ve Tedavisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg [Internet]*. 2009;16(1):39–47.
15. Lee SH, Rubin LJ. Current treatment strategies for pulmonary arterial hypertension. *Journal of Internal Medicine*. 2005; 258: 199–215.
16. Travis WD, Colby Tv, Koss MN, Rosado-de-Christenson ML, Muller NL, King Jr TE. No Title. Washington: American Registry of Pathology and the Armed Forces Institute of Pathology; 2002. 92–767 p.
17. Ghamra ZW, Dweik RA. Primary pulmonary hypertension: An overview of epidemiology and pathogenesis. *Cleve Clin J Med*. 2003; Apr;70 Suppl 1:S2-8.
18. 19. Stuart Rich, Valerie V. Mc Laugghin. Pulmonary Hypertension In Braunwald E Z, DP, Libby P: *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine 6th Edition*. Philadelphia WBSC 2005:1807-1843. 19. Stuart Rich, Valerie V. Mc Laugghin. Pulmonary Hypertension In Braunwald E, Zipes DP, Libby P: *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine 6th Edition*. Philadelphia, W.B. Saunders Company 2005:1807-1843.
19. Dresdale DT, Schultz M, Michtom RJ. Primary pulmonary hypertension. *Am J Med*. 2004;11(6):686–705.
20. Provencher S, Hervé P, Sitbon O, Humbert M, Simonneau G, Chemla D. Changes in exercise haemodynamics during treatment in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2008; Aug;32(2):393-8
21. Shah SJ, Thenappan T, Rich S, Tian L, Archer SL, Gomberg-Maitland M. Association of serum creatinine with abnormal hemodynamics and mortality in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2008; May 13;117(19):2475-83
22. Tongers J, Schwerdtfeger B, Klein G, Kempf T, Schaefer A, Knapp JM, et al. Incidence and clinical relevance of supraventricular tachyarrhythmias in pulmonary hypertension. *Am Heart J*. 2007; Jan;153(1):127-32.
23. Campo A, Mathai SC, Le Pavec J, Zaiman AL, Hummers LK, Boyce D, et al. Outcomes of hospitalisation for right heart failure in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2011; Aug;38(2):359-67.
24. Morrell NW, Aldred MA, Chung WK, Elliott CG, Nichols WC, Soubrier

F, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* [Internet]. 2019;53(1):S32–42.

25. Harrison RE. Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*. 2003; Jul;41(7):576

26. Austin ED, Ma L, LeDuc C, Rosenzweig EB, Borczuk A, Phillips JA, et al. Whole exome sequencing to identify a novel gene (Caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012; Jun;5(3):336-43.

27. Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, et al. A Novel Channelopathy in Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med*. 2013; Jul 25;369(4):351-361.

28. Hartness ME, Lewis A, Searle GJ, O’Kelly I, Peers C, Kemp PJ. Combined Antisense and Pharmacological Approaches Implicate hTASK as an Airway O₂ Sensing K⁺ Channel. *J Biol Chem*. 2001; Jul 13;276(28):26499-508.

29. Lang RM, Badano LP, Victor MA, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: An update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015; Jan;28(1):1-39.e14.

30. Miller D, Farah MG, Liner A, Fox K, Schluchter M, Hoit BD. The relation between quantitative right ventricular ejection fraction and indices of tricuspid annular motion and myocardial performance. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004; May;17(5):443-7

31. Fisher MR, Forfia PR, Chamera E, Houston-Harris T, Champion HC, Girgis RE, et al. Accuracy of Doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; Apr 1;179(7):615-21.

32. Dabestani A, Mahan G, Gardin JM, Takenaka K, Burn C, Allfie A, et al. Evaluation of pulmonary artery pressure and resistance by pulsed Doppler echocardiography. *Am J Cardiol*. 1987; Mar 1;59(6):662-8.

33. Abbas AE, Fortuin FD, Schiller NB, Appleton CP, Moreno CA, Lester SJ. A simple method for noninvasive estimation of pulmonary vascular resistance. *J Am Coll Cardiol*. 2003; Mar 19;41(6):1021-7.

34. Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K, et al. Guidelines for the Echocardiographic Assessment of the Right Heart in Adults: A Report from the American Society of Echocardiography. Endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European

Society of Cardiology, and . J Am Soc Echocardiogr [Internet]. 2010;23(7):685–713.

35. Armstrong WF, Thomas R. Feigenbaum Ekokardiyografi, 7.baskı 2011.
36. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery J-L, Barbera JA, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the Internat. Eur Heart J. 2009;30(20):2493–537.
37. Tunariu N, Gibbs SJR, Win Z, Gin-Sing W, Graham A, Gishen P, et al. Ventilation-Perfusion Scintigraphy Is More Sensitive than Multidetector CTPA in Detecting Chronic Thromboembolic Pulmonary Disease as a Treatable Cause of Pulmonary Hypertension. J Nucl Med. 2007; May;48(5):680-4.
38. Resten A, Maitre S, Humbert M, Rabiller A, Sitbon O, Capron F, et al. Pulmonary hypertension: CT of the chest in pulmonary venoocclusive disease. American Journal of Roentgenology. 2004. ;183: 65-70.
39. Elwing JM, Vaidya A, Auger WR. Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: An Update. Clin Chest Med. 2018;39(3):605–20.
40. Reichelt A, Hoeper MM, Galanski M, Keberle M. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: Evaluation with 64-detector row CT versus digital subtraction angiography. Eur J Radiol. 2009; Jul;71(1):49-54.
41. Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, et al. How to diagnose diastolic heart failure: A consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. In: European Heart Journal. 2007. Oct;28(20):2539-50.
42. Rich S, Kaufmann E. The Effect of High Doses of Calcium-Channel Blockers on Survival in Primary Pulmonary Hypertension — NEJM. New Engl J 1992; Jul 9;327(2):76-81.
43. Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, Ios V, Hamid AM, Provencher S, et al. Long-Term Response to Calcium Channel Blockers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. 2005;3105–11.
44. Galiè N, Ussia G, Passarelli P, Parlangeli R, Branzi A, Magnani B. Role of pharmacologic tests in the treatment of primary pulmonary hypertension. Am J Cardiol. 1995; Jan 19;75(3)
45. McLaughlin V V., Genthner DE, Panella MM, Rich S. Reduction in Pulmonary Vascular Resistance with Long-Term Epoprostenol (Prostacyclin) Therapy in Primary Pulmonary Hypertension. N Engl J Med. 2002; Jan 29;338(5):273-7.

46. Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, et al. Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1998; Jan;31(1):202-8.
47. Williams MH, Handler CE, Akram R, Smith CJ, Das C, Smee J, et al. Role of N-terminal brain natriuretic peptide (N-TproBNP) in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2006; Jun;27(12):1485-94.
48. Torbicki A, Kurzyna M, Kuca P, Fijałkowska A, Sikora J, Florczyk M, et al. Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. *Circulation.* 2003; Aug 19;108(7):844-8.
49. Fang Y, Yeh C. Role of microRNAs in Vascular Remodeling. *Curr Mol Med.* 2015; Sep; 15(8): 684–696.
50. Bienertova-Vasku J, Novak J, Vasku A. MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension: Pathogenesis, diagnosis and treatment. *J Am Soc Hypertens [Internet].* 2015;9(3):221–34.
51. Zhou G, Chen T, Usha Raj J. MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;52(2):139–51.
52. Kamran MZ, Patil P, Gude RP. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
53. Cheng KJ, Bao YY, Zhou SH. The role of hypoxia inducible factor in nasal inflammations. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(24):5067–76.
54. J. Richard Brewer, Pierre Mazot and PS, Department. Brewer 等。 - 2016 - Genetic insights into the mechanisms of Fgf signal.pdf. *Genes Dev.* 2016;751–71.
55. Y. N. et al. Local microwave ablation with continued EGFR tyrosine kinase inhibitor as a treatment strategy in advanced non-small cell lung cancers that developed extra-central nervous system oligoprogressive disease during EGFR tyrosine kinase inhibitor treatment. *Med (United States) [Internet].* 2016;95(25)
56. Kim J. Apelin-APJ signaling: A potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *Mol Cells.* 2014;37(3):196–201.
57. Jasiewicz M, Moniuszko M, Pawlak D, Knapp M, Rusak M, Kazimierczyk R, et al. Activity of the kynurenine pathway and its interplay with immunity in patients with pulmonary arterial hypertension. *Heart.* 2016;102(3):230–7.
58. Estephan LE, Genuardi M V., Kosanovich CM, Risbano MG, Zhang Y,

Petro N, et al. Distinct plasma gradients of microRNA-204 in the pulmonary circulation of patients suffering from WHO Groups I and II pulmonary hypertension. *Pulm Circ*. 2019;9(2).

59. Kaymaz C, Mutlu B, Serdar Küçükoğlu M, Kaya B, Akdeniz B, Avcı BK, et al. Preliminary results from a nationwide adult cardiology perspective for pulmonary hypertension: Registry on clinical outcome and survival in pulmonary hypertension groups (SIMURG). *Anatol J Cardiol*. 2017;18(4):242–50.

60. Jin Y, Pang T, Nelin LD, Wang W, Wang Y, Yan J, et al. MKP-1 is a target of miR-210 and mediate the negative regulation of miR-210 inhibitor on hypoxic hPASMC proliferation. *Cell Biol Int*. 2015;39(1):113–20.

61. Lu Y, Huang J, Geng S, Chen H, Song C, Zhu S, et al. Mitokalp regulating HIF/miR210/ISCU signaling axis and formation of a positive feedback loop in chronic hypoxia-induced PAH rat model. *Exp Ther Med*. 2017;13(5):1697–701.

62. Gou D, Ramchandran R, Peng X, Yao L, Kang K, Sarkar J, et al. miR-210 has an antiapoptotic effect in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia. *AJP Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2012;303(8):L682–91.

63. Bertero T, Cottrill K, Krauszman A, Lu Y, Annis S, Hale A, et al. The microRNA-130/301 family controls vasoconstriction in pulmonary hypertension. *J Biol Chem*. 2015;290(4):2069–85.

64. Brock M, Haider TJ, Vogel J, Gassmann M, Speich R, Trenkmann M, et al. The hypoxia-induced microRNA-130a controls pulmonary smooth muscle cell proliferation by directly targeting CDKN1A. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2015;61:129–37.

65. Paulin R, Courboulin A, Barrier M, Bonnet S. From oncoproteins/tumor suppressors to microRNAs, the newest therapeutic targets for pulmonary arterial hypertension. *J Mol Med*. 2011;89(11):1089–101.

66. Meloche J, Pflieger A, Vaillancourt M, Paulin R, Potus F, Zervopoulos S, et al. Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2014;129(7):786–97.

67. Alhawaj R, Patel D, Kelly MR, Sun D, Wolin MS. Heme biosynthesis modulation via δ -aminolevulinic acid administration attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2015;308(7):L719-L728 is modulation with delta-aminolevulinic a.

68. Courboulin A, Paulin R, Giguère NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, et al. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med* [Internet]. 2011;208(3):535–48.

69. Zeng Y, Zhang X, Kang K, Chen J, Wu Z, Huang J, et al. MicroRNA-223 Attenuates Hypoxia-induced Vascular Remodeling by Targeting RhoB/MLC2 in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(October 2015):1–13.
70. Gubrij IB, Pangle AK, Pang L, Johnson LG. Reversal of microRNA dysregulation in an animal model of pulmonary hypertension. *PLoS One*. 2016;11(1):1–16.
71. Meloche J, Le Guen M, Potus F, Vinck J, Ranchoux B, Johnson I, et al. miR-223 reverses experimental pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol - Cell Physiol* [Internet]. 2015;309(6):C363–72.
72. Shi L, Kojonazarov B, Elgheznawy A, Popp R, Dahal BK, Böhm M, et al. MiR-223-IGF-IR signalling in hypoxia- and load-induced right-ventricular failure: A novel therapeutic approach. *Cardiovasc Res*. 2016;111(3):184–93.
73. Kim J, Kang Y, Kojima Y, Lighthouse JK, Hu X, Aldred MA, et al. An endothelial apelin-FGF link mediated by miR-424 and miR-503 is disrupted in pulmonary arterial hypertension. *Nat Med* [Internet]. 2013;19(1):74–82.
74. Yang P, Read C, Kuc RE, Nyimanu D, Williams TL, Crosby A, et al. A novel cyclic biased agonist of the apelin receptor, MM07, is disease modifying in the rat monocrotaline model of pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol*. 2019;176(9):1206–21.
75. Zhao H, Xue Y, Guo Y, Sun Y, Liu D, Wang X. Inhibition of endocan attenuates monocrotaline-induced connective tissue disease related pulmonary arterial hypertension. *Int Immunopharmacol*. 2017;
76. Kanbay A, Ceylan E, Köseoğlu Hİ, Çalışkan M, Takir M, Tulu S, et al. Endocan: a novel predictor of endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea syndrome. *Clin Respir J*. 2018;12(1):84–90.
77. Campochiaro C, Lytton S, Nihtyanova S, Fuchs D, Ong VH, Denton CP. Elevated kynurenine levels in diffuse cutaneous and anti-RNA polymerase III positive systemic sclerosis. *Clin Immunol* [Internet]. 2019;199(February):18–24.