

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**DÜZENLİ AEROBİK EGZERSİZLE OLUŞTURULAN
KARDİYAK HİPERTROFİNİN MİKRORNA İLE İLİŞKİSİ**

MUKADDES PALA

**DANIŞMAN
PROF. DR. GÖKHAN METİN**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2016

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü . . Cerrahpaşa Tıp.
. Fakültesi, . . Fizioloji Anabilim Dalı,
. Doktora. Programında Doktora öğrencisi . . .
.Mukaddes Pala tarafındanProf.Dr. Gökhan Metin'
. 'in danışmanlığında hazırlanan “. . . Düzenli Aerobik
Egzersizle Oluşturulan Kardiyak Hipertrofinin MikroRNA İle İlişkisi.
.” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından .20 . / .9 . /2016. . tarihinde yapılan Tez
Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı

Prof.Dr. Gülderen ŞAHİN
Cerrahpaşa Tıp Fak.
Fizioloji Anabilim Dalı



Jüri-Danışman

Prof.Dr. Gökhan METİN
Cerrahpaşa Tıp Fak.
Fizioloji Anabilim Dalı



Jüri

Doç.Dr. Fahri AKBAŞ
Bezmialem Üniversitesi Tıp Fak.
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
(1.Yedek Jüri Üyesi)

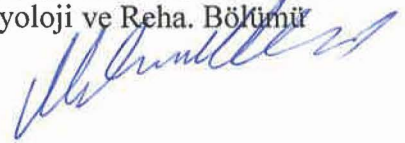
Jüri

Prof.Dr. İnci Alican
Marmara Üniversitesi Tıp Fak.
Fizioloji Anabilim Dalı



Jüri

Prof.Dr. Mehmet ÜNAL
Y.Yüzyıl Üniversitesi SABİF
Fizioloji ve Reha. Bölümü



BEYAN

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

MUKADDES PALA (İmza)



İTHAF



**Dürüst, fedakar, mücadeleci ve onurlu bir yaşam süren
annem ve babama ithaf ediyorum.**

TEŞEKKÜR

Akademik hayatta gelişmemi sağlayan, etik değerleri benimseyen, öğreten ve uygulayan, hayata bakış açımı değiştiren, yenilikleri takip etmemi sağlayan, tecrübelerinden her zaman faydalandığım danışman hocam **Prof. Dr. Gökhan Metin'e**,

Ders anlatımını hayranlıkla takip ettiğim ve örnek aldığım, bilimsel yeniliklere olan ilgisini ve heyecanını hiç kaybetmeyen Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Gülderen Şahin'e**,

Moleküler yöntemlerin belirlenmesinde, çalışılmasında ve sonuçların yorumlanmasında büyük katkıları olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Doç. Dr. Fahri Akbaş'a**,

Tez konumun belirlenmesinde, deneysel aşamaların yürütülmesinde, sonuçların değerlendirilmesinde, tez verilerimin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde ve yorumlanmasında önemli katkıları olan, desteklerini esirgemeyen Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı uzmanları **Dr. Mehmet Altan, Dr. Osman Fuat Sönmez ve Dr. Murat Mengi'ye**,

Ekokardiyografik ölçümleri yapan ve yorumlayan İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü Öğretim üyesi **Prof. Dr. Mustafa Yıldız'a**,

Histolojik analizlerin seçilmesinde ve değerlendirmesinde katkıları olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Mukaddes Eşrefoğlu ve Yrd. Doç. Dr. Meltem Kumaş'a**,

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. İsmail Meral'e ve bölümümüzde bulunan çalışma arkadaşlarıma** değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. **Proje No: 48783**

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	Vİİİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	İXİ
ÖZET.....	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 EGZERSİZ ve TANIMI.....	2
2.2 EGZERSİZDE ENERJİ.....	3
2.2.1 Anaerobik Enerji Sistemi.....	3
2.2.2 Aerobik Enerji Sistemi.....	4
2.3 EGZERSİZİN GENEL ETKİLERİ VE EGZERSİZE UYUM.....	5
2.3.1 Egzersiz Tipleri.....	5
2.3.1.1 Dinamik Egzersiz.....	5
2.3.1.2 Statik Egzersiz.....	6
2.4 KARDİYOVASKÜLER SİSTEMİN EGZERSİZE UYUMU.....	7
2.4.1 Kalp Hızı.....	8
2.4.2 Kan Basıncı.....	9
2.4.3 Kalp Debisi.....	9
2.5 KARDİYAK HİPERTROFİ.....	10
2.5.1 Tanımı.....	10
2.5.2 Sınıflandırılması(Fizyolojik/Patolojik).....	11
2.5.3 Kardiyak Hipertrofiye Aracılık Eden Sinyal Yolakları.....	15
2.5.4 Tanı Kriterleri.....	18
2.5.5 Sporcu Kalbi.....	18

2.6 GENOM.....	19
2.6.1 Tanım.....	19
2.6.2 Yapısı.....	19
2.6.3 Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	21
2.6.3.1 Promotor.....	21
2.6.3.2 5' Untranslated Bölge (5' UTR).....	21
2.6.3.3 ORF (Açık Okuma Çerçevesi).....	22
2.6.3.4 İntronik Bölgeler.....	22
2.6.3.5 Düzenleyici Elementler (Enhanserlar).....	23
2.6.3.6 3' Untranslated Bölge (5' UTR).....	23
2.6.3.7 PolyA Tail.....	23
2.7 MikroRNA'lar.....	24
2.7.1 Tanım.....	24
2.7.2 Biyogenezi ve Fonksiyonları.....	25
2.7.3 Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesinde miRNA'ların Rolü.....	26
2.7.4 Dolaşımda Bulunan miRNA'lar.....	28
2.7.5 Kardiyovasküler Sistemin Gelişiminde miRNA'lar.....	30
2.7.5.1 miR-1/miR-133 Ailesi.....	30
2.7.5.2 Myomirler: miR-208a, miR-208b ve miR-499.....	31
2.7.5.3 miR-17/92 grubu.....	31
2.7.5.4 miR-15 Ailesi.....	32
2.7.6 Kardiyak Rejenerasyonda miRNA'lar.....	33
2.7.7 Kardiyomiyositlerin Proliferasyonu.....	34
2.7.8 Kardiyomiyositlerin Farklılaşması.....	35
2.7.9 Kardiyomiyositlerin Canlılığını Sürdürmesi.....	36
2.7.10 Kardiyomiyositlerin Yeniden Programlanması.....	38
2.8 KARDİYAK HİPERTROFİDE miRNA'LARIN ROLÜ.....	40
2.9 FİZYOLOJİK KARDİYAK HİPERTROFİDE miRNA'LARIN ROLÜ.....	41
2.10 DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KARDİYAK HİPERTROFİ MODELLERİNDE KULLANILAN EGZERSİZ ÇEŞİTLERİ.....	43
2.11 ÇALIŞMADA KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER.....	44
2.11.1 Mikroarray Yöntemi.....	44
2.11.1.1 Afimetriks Gen Çip Yöntemi.....	44

2.11.2 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR).....	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1 ÇALIŞMADA YER ALAN HAYVANLAR ve DENEY GRUPLARI.....	47
3.2 EGZERSİZ PROTOKOLÜ.....	47
3.3 EKOKARDİYOĞRAFİ.....	48
3.4 ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	48
3.5 MOLEKÜLER ANALİZLER	49
3.6 HİSTOLOJİK ANALİZLER.....	54
3.7 İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	55
4. BULGULAR.....	56
4.1 EKOKARDİYOĞRAFİK ÖLÇÜMLERİN SONUCU.....	56
4.2 MOLEKÜLER ANALİZLERİN SONUCU.....	57
4.3 HİSTOLOJİK ANALİZLERİN SONUCU.....	75
5. TARTIŞMA.....	80
KAYNAKLAR.....	90
ETİK KURUL KARARI.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	107

TABLOLAR LISTESİ

Tablo 1: Fizyolojik ve Patolojik Kardiyak Hipertrofinin Özellikleri	14
Tablo 2: Kalpte kardiyak hipertrofi esnasında önemli oranda upregüle ve downregüle olan miRNA'lar ve hedef genleri	43
Tablo 3: miRNA mikroarray analizinden sonra validasyonda kullanılan genlerin primer dizileri.....	53
Tablo 4: Ekokardiyografiyle kalp fonksiyonunun değerlendirilmesi.....	56
Tablo 5: Upregüle olan miRNA'lar.....	57
Tablo 6: Down regüle olan miRNA'lar.....	61
Tablo 7: Ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için seçilen miRNA'lar.....	61
Tablo 8: Ekspresyonları değerlendirilen miRNA'ların Hedef Genlerinin Belirlenmesi.....	62
Tablo 9 : miR-194-5p ekspresyon düzeyi	65
Tablo 10: miR-350 ekspresyon düzeyi	66
Tablo 11 : miR-132-3p ekspresyon düzeyi.....	66
Tablo 12 : miR-98-5p ekspresyon düzeyi.....	67
Tablo 13 : miR-192-5p ekspresyon düzeyi.....	67
Tablo 14 : miR-106b-5p ekspresyon düzeyi.....	68
Tablo 15 : miR-466b2-3p ekspresyon düzeyi.....	68
Tablo 16 : miR-290 ekspresyon düzeyi.....	69
Tablo 17 : miR-6332 ekspresyon düzeyi.....	69
Tablo 18: miR-194-5p serum ekspresyon düzeyi.....	70
Tablo 19: miR -350 serum ekspresyon düzeyi	71
Tablo 20: miR-132-3p serum ekspresyon düzeyi	71
Tablo 21 : miR-98-5p serum ekspresyon düzeyi	72
Tablo 22 : miR-192-5p serum ekspresyon düzeyi.....	72
Tablo 23: miR-106b-5p serum ekspresyon düzeyi	73
Tablo 24: miR-466b2-3p serum ekspresyon düzeyi.....	73
Tablo 25 : miR-290 serum ekspresyon düzeyi.....	74
Tablo 26: miR-6332 serum ekspresyon düzeyi.....	75

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Kardiyak hipertrofinin gelişimindeki hücresel aşamalar.....	11
Şekil 2: Fizyolojik ve patolojik Kardiyak Hipertrofi.....	12
Şekil 3: Fizyolojik ve patolojik KH'de ortak ve farklı eksprese olan gen kümeleri.....	15
Şekil 4: Kardiyak hipertrofiye neden olan sinyal yollarının şematik gösterimi.....	17
Şekil 5: Fizyolojik ve patolojik arasındaki farklılıkların gösterimi.....	18
Şekil 6: Kodlamayan gen bölgesindeki düzenleyici elementler.....	21
Şekil 7 : miRNA biyosentezinin şematik gösterimi.....	27
Şekil 8: miRNA temelli gen ekspresyonu düzenlenmesinin farklı modelleri	29
Şekil 9: miRNA'ların hücresel salınma mekanizmaları ve ekstrasellüler taşıma sistemleri..	30
Şekil 10: MikroRNA'ları degradasyondan koruyan mekanizmalar.....	31
Şekil 11: Kalbin embriyonik gelişimi esnasında kodlamayan RNA'ların fonksiyonel rolü....	35
Şekil 12: Kardiyak rejenerasyonda yer alan kodlamayan RNA'lar	41
Şekil 13: KH'nin gelişiminden sorumlu olan miRNA'ların yer aldığı süreçlerin şematik gösterimi.....	42
Şekil 14: Fizyolojik kardiyak hipertrofinin miRNA'lar tarafından düzenlenmesi	43
Şekil 15: Mikroarray yönteminin şematik gösterimi	47
Şekil 16: miR-194-5p'nin kalp dokusunda ekspresyon düzeyi.....	64
Şekil 17: miR-290'nun kalp dokusunda ekspresyon düzeyi.....	64
Şekil 18: miR-132-3p'nin kalp dokusunda ekspresyon düzeyi.....	65
Şekil 19: Kontrol grubuna ait kalp dokularının normal histolojik görünümü	76
Şekil 20: Egzersiz grubunda kalp dokusunda kanama ve ödem ile nekrotik alanların görünümü.....	76
Şekil 21: Egzersiz grubunda kalp dokusunda nekrotik alanların görünümü	77
Şekil 22:Egzersiz grubunda kalp dokusunda yoğun kanama ve ödem alanları ile nekrotik alanların görünümü	77
Şekil 23: Egzersiz grubunda kalp dokusunda konjesyonun görünümü	78
Şekil 24: Kontrol ve egzersiz gruplarında ortalama histopatolojik skora ait bar grafiği.....	78
Şekil 25: Kalp hücrelerinde TUNEL floresan boyama tekniği ile apoptotik hücrelerin görünümü.	79
Şekil 26: PCNA pozitif hücrelerin ışık mikroskopik görünümü	80

.SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESİ

ACE : Anjiotensin-Konverting Enzim

AE : Aerobik Egzersiz

Ang II: Anjiotensin II

ATP: Adenozin Trifosfat

ADP: Adenozin Difosfat

AMP: Adenozin Monofosfat

Bim: BH3-domain-içeren protein

BRE: B-Tanıma Elementi

cDNA: Komplementer DNA

Check1: Hücre Siklusunu Kontrol Eden Kinaz1 Geni

CT: Eşikdeğer Döngüsü

CT-1: Kardiyotrofin 1

CTGF: Bağlayıcı Doku Büyüme Faktörü

DCE: Downstream Kor Element

DGCR8: DiGeorge Kritik Bölge 8

DPE: Downstream Promotor Elementi

eIf: Translasyonu Başlatan Faktör

ET-1: Endotelin 1

FS: Fraksiyonel Kısalma

GPCR: G Proteiniyle Eşleşen Reseptör

HDL: Yüksek Dansiteli Lipoprotein

Hif1: Hipoksi-inducible Factor

HSF1: Isı Şok Proteini Transkripsiyon Faktörü

IGF1: İnsülin-like Growth Factor 1
INR: Başlatıcı Element
IPS: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
IRES: İnternal Ribozom Bşlangıcı
IVS: İnterventriküler Septum Kalınlığı
JAK: Janus Kinaz
KAH: Kalbin Atım Hızı
KH: Kardiyak Hipertrofi
Klf15: Kruppel-like Faktör 15
KD: Kalp Debisi
LncRNA: Uzun Kodlamayan RNA
LPWT: Posterior Duvar Kalınlığı
LV: Sol ventrikül
LV mass: Sol ventrikül kütlesi
LVDs: Sol Ventrikül Sistolik Çapı
LVDD: Sol Ventrikül Diyastolik Çapı
LVEF: Sol Ventrikül Ejeksiyon Fraksiyonu
LVFS: Sol Ventrikül Fraksiyonel Kısalma
MAPK: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
Mef2: Miyosit Enhanser Faktör 2
MTE: Motif Ten Element
mRNA: Haberci RNA
miRNA: mikroRNA
MMP9: Matriks Metalloproteinaz 9
MVB: Multiveziküler Cisim
NFAT: Nükleer Faktörle Aktive Olan T Hücreleri

NPM1: Nükleofosmin-1

ORF: Açık Okuma Çerçevesi

PABP: mRNA'nın polyA Bölgesine Bağlanan Protein

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PDCD4: Programlı Hücre Ölümü Protein 4

PIC: Erken Başlatma Kompleksi

PI3K: Fosfoinositid 3-kinaz

PI3K, p110 α : IGF-1-Fosfoinositid 3-kinaz-Akt Yolağı

PKC: Protein Kinaz C

PKD: Protein Kinaz D

Pre-mRNA: Ön haberci Mrna

Pre-miRNA: Preliminary-miRNA

Pri-miRNA: Primer mikroRNA

PNUTS: Serin/Threonin-protein Fosfataz 1 Düzenleyici Alt Ünite 10

PTEN1: Fosfataz ve Tensin 1

RIP: Receptor İnteracting Protein

RISC: RNA'ya Bağlı Oluşan Sessizlik Komponenti

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RTK: Reseptör Tirozin Kinaz

SNP: Tek Nükleotid Değişikliği

Splising: Kesip-çıkarma

SRF: Serum Cevap Faktörü

TAC: Transvers Aortik Konstriksiyon

TF: Transkripsiyon Faktörü

TGF- β : Transforming Büyüme Faktörü- β

TLR2: Toll-like reseptör 2

TSS: Transkripsiyon Başlama Bölgesi

UPE: Upstream Promotor Elementi

UTR: Translasyona Uğramayan Bölge

VO_{2max}: Tüketilen Maksimum Oksijen Miktarı

XCPE1: X-Kor Promotor Element 1



ÖZET

Pala, M. Düzenli Aerobik Egzersizle Oluşturulan Kardiyak Hipertrofinin mikroRNA İle İlişkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji AD, Doktora Tezi, (2016), İstanbul.

Kardiyak hipertrofi (KH), miyokardın, değişen stres koşullarına maruz kalması ya da hasarlanması durumunda görülen adaptasyonel büyümedir. Egzersizin sebep olduğu KH fizyolojik bir kalp büyümesi çeşididir.

MikroRNA (miRNA)'lar kardiyak gelişmeyi, hipertrofiyi ve angiogenezi düzenlemektedir. miRNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde hedef mRNA'nın ya degradasyonunu artırarak ya da translasyonu inhibe ederek rol alır.

Bu çalışmada, aerobik egzersize kaynaklı KH'de miRNA'ların düzenleyici rolü incelendi. Bu amaç için Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar egzersiz grubu (EG, n=9) ve kontrol grubu (KG, n=6) olarak ayrıldı. Yüzme seansları 60 dk/ 5 gün/ 8 hafta ile başladı ve 9. haftada günde 2 kez ve 10. haftada ise 3 kez ile devam etti. KH'yi değerlendirmek için sol ventrikülün sistolik ve diyastolik çapları ve miyokardın duvar kalınlıkları ekokardiyografiyle ölçüldü. miRNA'ların analizi, miRNA mikroarray yöntemiyle gerçekleştirildi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR) yöntemiyle doğrulandı.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre fizyolojik KH'de miR-132-3p ve miR-290 genlerinin ekspresyonlarındaki değişikliklere bağlı olarak kalbin fibrozisten korunabileceği kanaatindeyiz. miR-132-3p'nin ekspresyonu hedef geni olan MMP9 aracılığıyla artarken ve miR-290'nin ekspresyonu ise hedef geni Klf15 aracılığıyla azalmaktadır. Bu bulgulara ilave olarak, çalışmamızda kardiyak hipertrofinin miR-194-5p geninin ekspresyonundaki artmadan dolayı oluştuğu tanımlandı. Transkripsiyon faktörleri olan Hand1 ve Hand2 genleri mir-194-5p'nin hedef genleri olup nukleusta bulunmaktadır. Ayrıca bu miRNA genlerinin KH sinyal yollarından biri olan NFAT sinyal yolağında yer aldığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kardiyak hipertrofi, yüzme egzersizi, fizyolojik kardiyak hipertrofi, dolaşımdaki miRNA'lar, gen ekspresyonu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 48783

ABSTRACT

Pala, M. Relationship between regular aerobic exercise-induced cardiac hypertrophy and microRNA. İstanbul University, Institute of Health Science, Physiology. Doktora Tezi, (2016), İstanbul.

Cardiac hypertrophy (CH) is an adaptational enlargement of the myocardium in exposure to altered stress conditions or occurs in case of injury. Exercise-induced CH is a type of physiologic CH.

MicroRNAs (miRNAs) regulate cardiac development, hypertrophy and angiogenesis. miRNAs act as regulators of gene expression by promoting the degradation or inhibiting the translation of target mRNAs.

In this study, we investigated the regulatory role of miRNAs in aerobic exercise-induced cardiac hypertrophy. For this purpose male Sprague-Dawley rats were used. Rats were divided into Training-group (TG, n=9) and Control-group (CG, n=6). Swimming sessions started with 60 min/5 day/8 wk and continued with on the 9th wk 2x/day, and on the 10 th wk 3x/day. Systolic and diastolic dimensions of the left ventricle and myocardial wall thickness were measured by echocardiography to assess the cardiac hypertrophy. miRNAs analysis was performed by miRNA microarray and confirmed by real-time PCR.

We suggest that in physiologic cardiac hypertrophy, heart may be protected from fibrosis due to changes in the expression of the genes miR-132-3p and miR-290. Expression of miR-132-3p increases through its target gene MMP9 and the expression of mir-290 decreases through its target gene Klf15. In addition to these findings we identified that cardiac hypertrophy occurs due to increase in the expression of miR-194-5p. Transcription factors Hand1 and Hand2 are target genes of the miR-194-5p and are located in the nucleus. Furthermore, we determined that these 3 miRNA genes are involved in the NFAT pathway which is one of the CH signaling pathways.

Key words: Cardiac hypertrophy, swimming training, physiological cardiac hypertrophy, circulating miRNAs, gene expression

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No.48783



GİRİŞ VE AMAÇ

Kardiyak hipertrofi, farklı stres koşulları ya da hasarlanmaya karşı miyokardın adaptasyonel genişlemesi olarak ifade edilebilir. Kardiyak hipertrofi; zaman zaman hipertansiyon, iskemik miyokard hasarı, diabetik kardiyomiyopati, valvular disfonksiyon ve aort stenozu ile ilişkili kalp hastalıkları gibi birden çok sayıdaki klinik hastalıkta görülebilen patolojik bir özellik olmaktadır. Kronik kardiyak hipertrofi süreci ventriküler dilatasyona, aritmiye, fibrotik hastalıklara, kalp yetmezliğine ve hatta ani ölüme neden olabilmektedir.

Patolojik klinik tabloların dışında; düzenli yapılan dayanıklılık tip egzersiz programları da bir taraftan aerobik kapasiteyi artırırken diğer yandan fizyolojik adaptasyonel bir süreç içinde yine kardiyak hipertrofiye yol açabilmektedir.

Yakın zamanda MikroRNA (miRNA)'ların; kardiyovasküler gelişmede, vasküler anjiogenezde ve çeşitli kalp hastalıklarında gen düzenleyicisi olarak rol oynadıkları ortaya konmuştur. Bu doğrultuda kardiyak hipertrofi gelişim sürecindeki miRNA'ların rolüyle ilgili olarak insanda ve hayvan modellerinde yapılan birçok çalışmalar yapılmaktadır.

Bilindiği üzere, miRNA'lar endojen, tek zincirli, kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar gen ekspresyonunu mRNA'nın ya translasyonunu inhibe ederek ya da degrade olmasını artırarak düzenlemektedir. Ayrıca dolaşıma salgılanan mikroveziküllerde bulunan miRNA'ların alıcı hücreye transfer olarak hücre içi gen ekspresyonunu kontrol edebileceği ifade edilmektedir.

Biz bu çalışmamızda deneysel model olarak seçtiğimiz yüzme egzersizine yanıt olarak gelişen kardiyak hipertrofide rol alan miRNA'ları ve hedef genlerini belirleyerek bu genlerin bulunduğu kardiyak hipertrofi sinyal yolağını belirlemeye çalıştık. Böylece kardiyak fibrozisi önleyebilecek yeni miRNA'ları tanımlayabilmeyi ve kanda kardiyak fibrozisi gösterebilecek bir belirteç bulmayı hedefledik. Böylece genç sporcularda görülen ani kalp ölümlerinin önüne geçilebileceğini düşünmekteyiz.

1. GENEL BİLGİLER

2.1 EGZERSİZ ve TANIMI

Egzersiz; organizmada doğal stres koşulları oluşturan ve performans artışı hedefine yönelik hareket süreçlerinin sistematik tekrarında, organizmanın çeşitli adaptasyon mekanizmalarıyla yanıt verdiği fiziksel aktiviteler olarak tanımlanabilmektedir.

Egzersize bağlı adaptasyonların gelişebilmesi için dikkatli bir şekilde planlanmış programlara ihtiyaç vardır. Bu programlarda egzersize başlangıçtaki form düzeyi, egzersizin tipi, egzersizin şiddeti, egzersizin süresi ve sıklığı, dinlenme aralıkları ve uygun müsabakaların düzenlenmesi gibi faktörler yer almalıdır. Performans ve form durumunda ulaşılmak istenen hedeflere göre bu faktörlerin uygulanmasında değişiklikler görülmektedir (1).

Egzersize verilen cevabın büyüklüğü, egzersize başlarken sahip olunan form düzeyine bağlı olarak değişmektedir. Form düzeyi düşük olan kişilerin aerobik kapasitelerinde artma daha fazla olurken, elit sporcuların aerobik kapasitelerindeki artış oranı az olmaktadır (2).

Egzersiz tipleri; dinamik ve statik olarak sınıflandırılmaktadır. Seçilen egzersiz tipine göre oluşan adaptasyonlarda farklılıklar görülmektedir. Aerobik egzersizde (AE); kalbin atım hızında artmaya ve solunumda hızlanmaya neden olan büyük kas grupları kullanılmaktadır (1).

Egzersizin şiddeti, egzersiz sıklığının ve süresinin temel belirleyicisidir. Egzersiz şiddeti; kalbin atım hızı (KAH) ve tüketilen maksimum oksijen miktarıyla (VO_2 max) doğrudan ilişkilidir. Egzersiz sırasında artan iş yüküne bağlı olarak hem kalbin atım hızında, hem de tüketilen oksijen miktarında artma meydana gelir. Etkili bir egzersizin şiddeti KAH'da %60-90 ve VO_2 max'da ise %50-85 aralığında olmalıdır. Egzersizin şiddeti artırıldığında, aerobik sisteme özgü adaptasyonlar olan kardiyovasküler yüklenmede ve performans sergilenen kaslarda gelişme gözlenirken, egzersizin şiddeti azaltıldığında VO_2 max'daki artış daha az olmaktadır (1, 2).

Genellikle 30 dk uygulanan egzersiz seanslarının pratik ve etkili olduğu belirtilirken (1), AE için önerilen sıklık, haftada minimum 2 ile 3 gündür (2).

Dinlenme aralıkları, egzersizin belli bir süre devam edebilmesi için gerekli olan süredir. Egzersizle dinlenme aralıkları arasındaki ilişki 1:1 ile 1:3 oranında olabilmektedir.

Düzenli ve yeterli şiddette yapılan egzersiz; birçok sistemin çalışması üzerine olumlu yönde etkili olmakla birlikte; kardiyak hastalıklar, obezite, insülin bağımsız diyabet, yüksek tansiyon ve osteoporoz gibi çeşitli hastalıkların önlenmesinde, tedavisinde ve organizmanın strese karşı direncinin artırılmasında da ayrıca önemli rol oynamaktadır (1,3).

Egzersizin yapılabilmesi için enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır. Egzersiz esnasında enerji kaynağı olarak karbonhidratlar, yağlar ve proteinler kullanılmaktadır. Kasların ana enerji kaynağı, kas glikojeni olarak depolanan karbonhidratlardır. Egzersiz sırasında enerjinin hangi kaynaktan ve hangi yolla sağlanacağı; egzersiz yapan organizmanın performans düzeyine, egzersizin türüne, şiddetine ve süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (4,5).

2.2 EGZERSİZDE ENERJİ

Egzersizin başlangıç aşamasındaki enerji ihtiyacı depolanmış olan Adenozin trifosfat (ATP)'den sağlanmaktadır. Hücrelerde bulunan ATP depoları sınırlı olduğu için, gereken ATP üretimi anaerobik ve aerobik olarak sınıflandırılan iki metabolik sistem tarafından devam ettirilir (1,6).

2.2.1 Anaerobik Enerji Sistemi

Anaerobik enerji sistemi; fosfajen sistem ve laktik asit sisteminden oluşmaktadır.

Kas kasılmasında kullanılan enerji kaynağı ATP'dir. ATP'nin yapısında yüksek enerjili fosfat bağları bulunmakta olup, bu bağların her birinde 7.300 kalorilik enerji depo edilmektedir. Molekülden bir fosfat kökü ayrıldığında kasılma için gerekli olan enerji serbestlenir. Bir fosfatın ayrılmasıyla ATP, adenozin difosfata (ADP), ikinci fosfatın ayrılmasıyla da adenozin monofosfata (AMP)'ye dönüşmektedir.

İyi antrene sporcuların kaslarında, en yüksek kas gücünü 3 sn sürdürebilecek kadar ATP bulunmaktadır. Birkaç sn dışındaki kısa süreli sportif aktivitelerin devam edebilmesi için ATP'nin sürekli olarak yapılması gerekir.

Fosfokreatin yüksek enerji bağı içeren kimyasal bir bileşik olup, yapıtaşları olan kreatin ve fosfat iyonlarına ayrılmaktadır. Fosfokreatinin her molekülünde 10.300 kalori vardır.

Fosfokreatinden ATP'ye enerji transferi çok kısa sürede gerçekleşir. Bu nedenle hızlı kas kasılmalarında fosfokreatin de kullanılmaktadır.

Fosfajen enerji sistemi, ATP ile fosfokreatinden oluşmaktadır. Fosfajen sistem, 8-10 sn süreli aktivitelerde yeterli olabilecek kas gücünü sağlayabilmektedir. Bu sistemin enerjisi, 100 m koşusu gibi kısa süreli patlayıcı kas gücü gerektiren aktivitelerde kullanılmaktadır.

Laktik asit sisteminde; glikojen glikoza parçalanır. Bu sürecin ilk aşamasına glikoliz denir ve tamamen oksijensiz ortamda gerçekleşir. Glikolizde, her bir glikoz molekülü iki tane pirüvik asit molekülüne ayrılır ve serbestlenen enerjiyle 4 ATP molekülü oluşur. Oksijen azlığında pirüvik asidin çoğu laktik aside dönüşerek, kas hücrelerinden hücrelerarası sıvıya ve kana difüze olur. Kas glikojeninin büyük bölümü laktik aside çevrilir ve 1 mol glikozdan 2 mol ATP elde edilebilir.

Laktik asit sisteminde ATP moleküllerinin üretilmesi, oksidatif mekanizmayla ATP üretilmesinden 2.5 kat kadar daha hızlıdır. Kasların kısa ve orta süreli zaman birimlerindeki kasılmaları için çok miktarda ATP gerektiğinde anaerobik glikolitik mekanizma tercih edilir. Ancak bu sistem fosfajen sistem kadar hızlı değildir. En uygun koşullarda laktik asit sistemi, fosfajen sistemin sağladığı 8-10 sn'ye ek olarak 1.3-1.6 dk'lık en yüksek kas aktivitesini sağlarsa da kas gücünde bir miktar azalmaya neden olmaktadır. Uzun süre devam eden yüksek yoğunluklu egzersizde kaslarda laktik asit birikeceği için yorgunluğa neden olabilecektir (6,7).

2.2.2 Aerobik Enerji Sistemi

Aerobik sistemde elde edilen enerji besin maddelerinin mitokondride oksidasyonu ile gerçekleşir. ATP'nin aerobik yoldan elde edilmesine oksidatif fosforilasyon denir. Aerobik enerji sistemi, krebs siklusu ve elektron transport zincirinden oluşur.

Elde edilen enerjiler açısından aerobik sistemle anaerobik sistem karşılaştırıldığında, aerobik enerji sisteminde daha fazla ATP üretilmektedir. 1 mol karbonhidrat yıkılırsa, 39 mol ATP açığa çıkar. Bu tepkimelerin başlayabilmesi için anaerobik reaksiyonlar sonucu sitozolde pirüvat oluşur. Pirüvat dekarboksile olduktan sonra koenzim A ile birleşerek Asetil-CoA'yı oluşturur. Asetil CoA, mitokondride krebs siklusuna girer. Krebs siklusunda üretilen hidrojen iyonları ve elektronlar mitokondri matriksinde elektron taşıma sisteminde rol alırlar. Buradaki tepkimeler sonucu 36 mol ATP üretilir (1,6).

Egzersiz süresine ve şiddetine bağlı olarak aerobik ve anaerobik enerji üretim sistemleri arasında geçişler olur ya da sistemler birlikte çalışır. Düşük şiddetli egzersizlerde, enerji sağlama yolu genelde aerobiktir. Bu tip egzersizlerde laktat seviyesindeki artış yavaştır ve diğer dokular tarafından metabolize edilerek birikimi engellenir. Böylece egzersiz daha uzun süre devam ettirilebilir. Egzersizin yoğunluğu arttıkça, aerobik ve anaerobik sistemlerin ikisi birden çalışır. Belli bir noktaya kadar enerji ihtiyacı aerobik sistemle sürdürülür ve daha sonra anaerobik sistemin katkısı daha çok olur. Bu noktaya “anaerobik eşik” denir. Anaerobik eşik düzeyi, kas ve venöz damarlardaki laktat artışının tespiti ile ortaya konur (8).

Egzersiz çeşitlerine göre kullanılan enerji sistemlerinde farklılıklar görülmektedir. Fosfajen sistem birkaç sn’lik kas gücü gerektiren kısa mesafe koşularında (100 m) kullanılırken, aerobik sistem uzun süreli sportif aktivitelerde ve laktik asit sistemi ise orta mesafe koşularında (200-800 m) daha fazla enerji sağlamak için tercih edilmektedir.

2.3 EGZERSİZİN GENEL ETKİLERİ ve EGZERSİZE UYUM

Egzersize uyumun gelişmesinde; yapılan aktivitenin yoğunluğu, süresi, bireyin cinsiyeti, hormonal dengesi ve genetik yapısı gibi çeşitli faktörler etkilidir. Uyum sürecinde bu faktörlerden en önemli olanı egzersiz tipinin farklılığıdır (1).

2.3.1 Egzersiz Tipleri

Egzersiz tipleri dinamik ve statik olmak üzere 2 grup olarak sınıflandırılmaktadır.

2.3.1.1 Dinamik Egzersiz

Uzun süreli dinamik egzersiz sırasında iskelet kası metabolizması aerobik olup, oksijen ihtiyacındaki artış fazladır. Sedanter bireylerin oksijen tüketimi, istirahatten maksimum egzersiz düzeyine ulaşmaya kadar yaklaşık 10 katlık bir artış gösterirken, elit sporcuların oksijen tüketimi daha çok olur. Elit sporcularda, arterio-venöz oksijen farkı ($a-VO_2$) ve dolayısıyla VO_{2max} daha yüksektir (9,10,11).

Dinamik egzersiz sırasında, egzersizde aktif olan kaslarda vazodilatasyon arttığı için periferik damar direnci düşer. Art-yükün azalmasıyla kalp debisi ve kaslardaki kan akımı fazla olur (12). Lokal otonöregülasyon mekanizmaları, vazodilatatör sinir uçlarının uyarılmasına neden olarak bu değişiklikleri meydana getirir (10,12).

Kaslardaki kan hacminin artması, kasların pompa etkisiyle kalbe olan venöz dönüşü artırır. Böylece sol ventrikülde gerim ve atım hacmi artar (Frank-Starling yasası). Egzersizin yoğunluğu arttıkça, refleks mekanizmalarla katekolaminlerin salgılanması artar ve kalp hızında artış görülür. Miyokardın kasılabilme gücünün artması için, diyastolik dolun zamanı kısılırken, atım hacmi artar (1,13,14,15).

2.3.1.2 Statik Egzersiz

Statik egzersizde, kas kasılırken sarkomerin boyunda değişiklik olmaz ve kas içindeki basınç artar. Kasa olan kan akımında azalma meydana gelir ya da kan akımı tamamen durur. Uzun süreli izometrik egzersiz sırasında kas kasılması için gereken enerji anaerobik mekanizmalarla sağlanır (16,17).

Çalışan kas gruplarının kütesinin artmasıyla kan basıncı daha çok artar. İzometrik kas kasılmasında ortalama arter basıncı yükselir. Kan basıncının artması ve venöz dönüşün engellenmesine bağlı olarak kalbin atım hacmi azalır. Çalışan kas gruplarının metabolik ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için kalp debisinin artması gerekir ki bu durum kalp hızında artmaya neden olur (18). İzometrik egzersiz devam ettiği sürece kalp hızı artar. Kalp debisi toparlanma periyodunun başlangıcında büyük artış göstermez. Başlangıçtaki kas kasılmaları venöz dönüşün artmasına neden olduğu için atım hacminin düzeyi değişmez (15,19).

Statik egzersiz boyunca, a-VO₂ farkı çok fazla değişmez. Kasılan kaslar kanın geçişini durdurduğu için O₂ dokular tarafından kullanılamaz. İzometrik egzersiz tamamlandıktan sonra a-VO₂ farkı, tekrar başlayan ve hızlanan akıma bağlı olarak artar. Çünkü egzersiz bittikten sonra kas yatağında O₂ tüketimi artmaktadır (19, 20).

İzometrik egzersiz süresince sistemik kan basıncı artmaktadır. Kan basıncındaki artış, kas yatağının kasılması ve total damar direncinin artmasıyla gerçekleşir (20). Statik egzersiz durdurulduğunda O₂ tüketimi ve kalp debisi geçici olarak artar. İzometrik kasılmanın uzaması kas iskemisinin gelişmesine neden olur. İskemi kas yatağındaki lokal mekanizmaları uyararak

vazodilatasyona neden olur. Böylece izometrik egzersiz süresince ortaya çıkan oksijen açığı kapatılmaya çalışılır (9,21).

2.4 KARDİYOVASKÜLER SİSTEMİN EGZERSİZE UYUMU

Egzersize kardiyovasküler sistemin uyumunda; yaş, cinsiyet, kişinin performans düzeyi ve genetik yapısı, uygulanan egzersizin tipi ve şiddeti, nörohumoral sistemin salgıları (epinefrin, norepinefrin) ve iskelet kaslarının mekanoreseptörleri önemli rol oynamaktadır (22,23,24). Egzersizde kalp debisi artarken, kan inaktif iç organlardan aktif olan kaslara doğru yönlendirilir (22,24).

Dokuların metabolik aktiviteleri arttığı için bölgesel kan akımı artırılır. İstirahat halinde dolaşımın %20'si iskelet kaslarına dağılırken, egzersiz sırasında bu oran %85 civarında olabilir (18,25,26).

Kardiyovasküler sistem artan enerji ihtiyacını karşılamak için, nöronlar ve lokal metabolitler aracılığıyla damar çapını değiştirerek kan akımını artırır. İç organlara giden damarlar kasılarak kanın, aktif kas dokularına yönlendirilmesi sağlanır. Yüksek yoğunluklu egzersizde aktif kas dokusunda bulunan arteriyoller genişlerken, iç organlardaki kan damarları geçici olarak kasılır ya da kapanır. Düşük yoğunluklu egzersizde, kan akımı iç organlardan aktif kas dokularına yönlendirilir. Kan akımının azaltılması ya da durdurulması; sempatik uyarının artmasına, lokal metabolitlerin kasılmayı uyarmasına veya diğer kasılmayı sağlayan faktörlerin artmasına bağlı olarak gerçekleşir. Egzersiz sırasındaki VO_2max ve $a-VO_2$ farkı artar (25).

Kalp, istirahat halindeyken koroner dolaşımında bulunan oksijenin yaklaşık %75'ini tutmaktadır. Egzersizde miyokardın da oksijene olan ihtiyacı artmakta olup, bu ihtiyaç koroner kan akımının artmasıyla sağlanmaktadır (27).

Egzersiz sırasındaki kalbin uyumu; kalp hızında, kan basıncında ve kalp debisinde görülen değişikliklerle gerçekleşmektedir.

2.4.1 Kalp Hızı

Egzersizle kalpte oluşan adaptasyon mekanizmalarından ilki kalp hızındaki artıştır. Kalp hızı egzersiz sırasında istirahat düzeyinin 3 katına kadar artabilir. Düşük şiddette ve sabit yükte yapılan egzersizlerde kalp hızı önce artar ve birkaç dakika içinde sabit bir düzeye erişir. Artan iş yüküne bağlı olarak kalp hızı da o oranda artar. Yüksek şiddet ve ağır yüklerle yapılan egzersizlerde kalp hızının sabit bir düzeye ulaşması zaman alır. Belli bir noktadan sonra iş yükü artırılrsa bile kalp hızında herhangi bir değişiklik meydana gelmez. Buna maksimum kalp hızı denir (28,29).

Egzersize başlamadan önce kasların kasılmasıyla ve psişik faktörlerin devreye girmesiyle kalp hızındaki artış görülür. Kalp hızındaki bu artıştan birkaç sn sonra bir düşüş ve hemen sonra maksimum kalp hızına doğru bir artış görülür. Maksimum kalp hızına ulaşmak 4-5 dk gibi bir zaman alabilir (29). Kalp hızındaki artışlar egzersizin tipine bağlı olarak değişiklik gösterir. 100 m koşusu gibi patlayıcı güç gerektiren sprint türü egzersizlerde kalp hızındaki artış en fazla olurken, ağırlık kaldırma gibi güç egzersizlerinde ise kalp hızındaki artış en azdır. Koşma veya yüzme gibi dayanıklılık egzersizlerinde ise kalp hızının artışı kademeli olarak gerçekleşmektedir (29,30).

Belirli bir iş yüküyle yapılan egzersizlerde antrene kişilerin kalp hızındaki artış, sedanter bireylerden daha azdır (29,30).

Egzersizde kalp hızında artma; vagal tonusun inhibitör etkisinin azalmasına, sempatik sinir sistemi aracılığıyla kalbin uyarılmasının artmasına, vücut ısısının yükselmesine ve adrenalin salgısının artmasına bağlı olarak gerçekleşir. Sempatik sistem, hem kalp hızında artmaya hem de miyokard fibrillerinin kasılma gücünün artmasına neden olmaktadır (31). Kalp hızının artması; kalbin işini ve oksijen tüketimini artırırken, sistolik ejeksiyon süresini ve diyastoldeki miyokardiyal kan akım süresini azaltır (24,29,31). Sporcularda istirahat durumunda bradikardi görülürken, egzersiz sırasındaki kalp atım hızı daha az olur ve diyastol süresi uzar. Ventriküller daha iyi dolar ve atım hacimleri de daha yüksek olur. Sporcularda kalp debisindeki artış, sıklıkla atım hacmindeki artışla sağlanmaktadır (32,33,34).

2.4.2 Kan Basıncı

Egzersiz sırasında kan basıncında görülen değişiklik en fazla sistolik basınçta meydana gelir. Egzersizde sistolik kan basıncı, uygulanan iş yüküne bağlı olarak artar. Koşma gibi egzersizlerde efora katılan kas kütlesi arttığında organizmanın total periferik direnci düşer. Bu durumda kan basıncının yükselmesi kalp debisinin artmasıyla sağlanır (12,35,36).

Egzersizde maksimum oksijen alındıktan sonra sistolik kan basıncındaki artış durur ve kan basıncı düşmeye başlar. Kan basıncındaki artma eforun şiddetine bağlı olarak değişiklik gösterir. İş yükü sabit kaldığında kan basıncında düşme yavaş olurken, deride bulunan damarlarda genişleme meydana gelir (29,35).

Egzersizde periferik damar direncinin düşmesiyle; diyastolik basınç ya değişmez, ya hafifçe artar ya da hafifçe azalır (12). Küçük kas gruplarını içeren egzersizler yapıldığında, damarlar daha az daralır ve total periferik direnç artar. Bu da kan basıncının artmasına neden olur (37,38). Egzersiz bittiğinde arteriyel kan basıncı önce hızlıca düşer, sonra biraz yükselir ve devamında ise normale döner. Arteriyel kan basıncının düşüşü, kaslardaki pompa etkisinin ortadan kalkmasıyla kanın genişleyen damarlarda birikmesiyle gerçekleşir. Kan basıncının yükselmesi ise refleks yoldan meydana gelen vazokonstriksiyon sonucu meydana gelir (39,40,41).

2.4.3 Kalp Debisi

Kalp debisi (KD), kalbin dakikadaki atım hacmidir. KD, kalbin atım hacmiyle kalp hızının çarpımından elde edilir. Egzersizde KD artar. KD'de artma; egzersizin yoğunluğuna ve süresine göre değişiklik gösterir. Maksimum egzersiz sırasında KD, istirahat değerinin yaklaşık 5 katına kadar artabilir (37,38). KD'deki artış, belli bir antrenman süresi geçirildikten sonra yapılan egzersizler sırasında daha net olarak görülür (33,42). Çizgili kaslarda meydana gelen ritmik kasılmalar, kalbe dönen kan miktarını artırarak önyükün artmasına neden olur. Önyükün artması, sol ventrikülün diyastol sonu hacmini ve basıncını artırır. Kalbin diyastol sonu hacmi arttıkça, ventriküldeki gerim de arttığı için kalbin kasılma gücü artar (33,42,44). Kalbe fazla iş yüklendiğinde 0-30 snlik süre içinde kalbin metabolizması artar. Damarların genişlemesiyle miyokarda daha çok kan gelir ve miyokard daha iyi beslenir (43-46).

2.5 KARDİYAK HİPERTROFİ (KH)

2.5.1 Tanımı

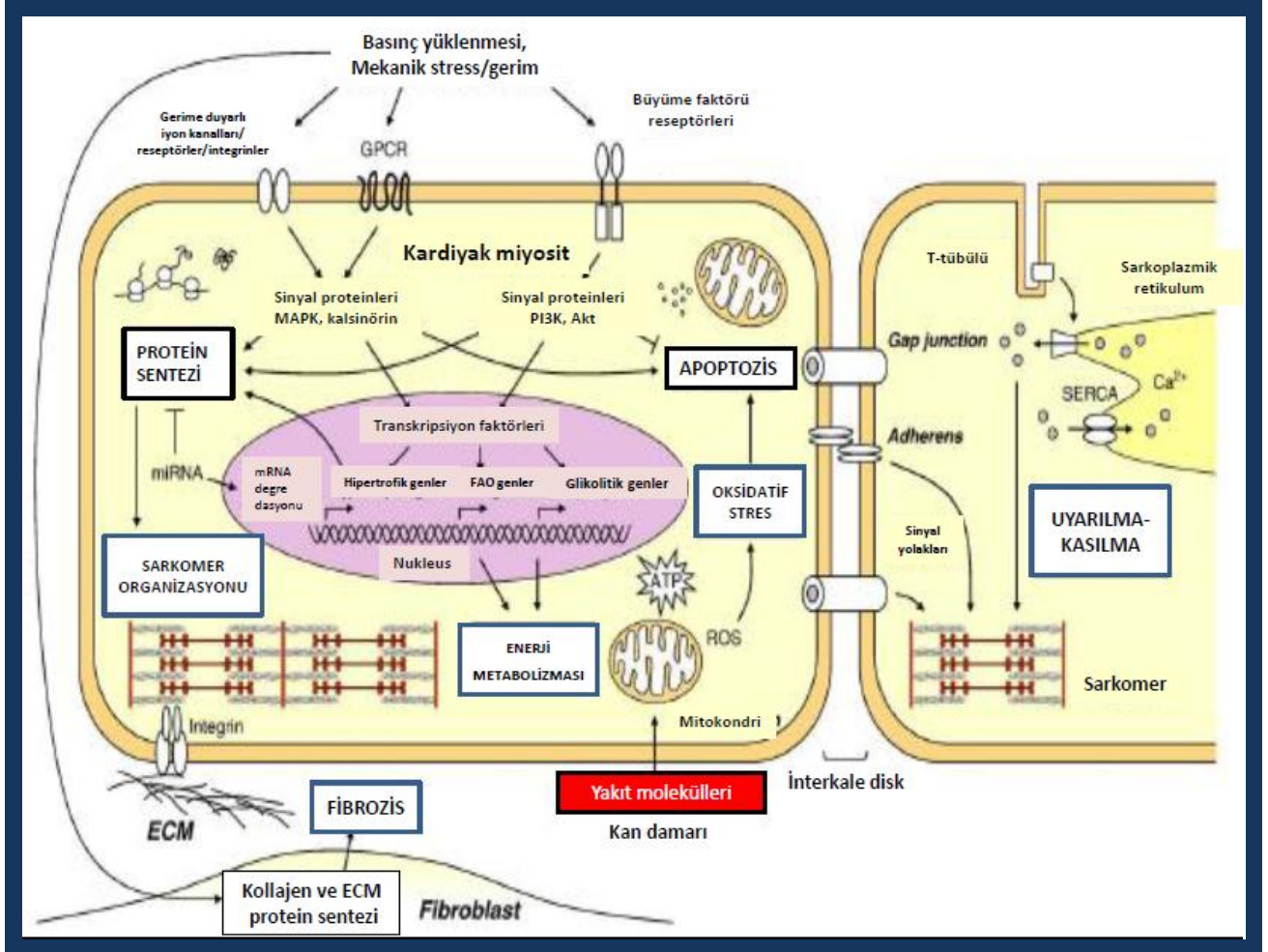
Kardiyak Hipertrofi (KH), kalp kütlesindeki artış olarak tanımlanmaktadır. Postnatal kalp büyümesi fonksiyonel yüklenmeyle yakından ilişkilidir (47). Artan yüklenmeye cevap olarak kalp, normal koşullardan daha fazla çalışmak zorundadır. Kalbin kronik strese dayanabilmesi için duvarında bulunan kas hücrelerinin boyut ve kütlesinde genişleme meydana gelir (48). Kalp kütlesindeki artış büyük oranda, ventrikül ağırlığındaki artıştan kaynaklanır.

Hüresel seviyede KH'nin fizyolojik ve patolojik olarak belirtilen iki farklı formu bulunmaktadır. KH'nin farklı formlarının ortaya çıkmasından moleküler mekanizmalar sorumludur (49).

Kalp, kardiyak miyositler (kas hücreleri), nonmiyositler (fibroblastlar, endotel hücreleri, mast hücreleri, vasküler düz kas hücreleri gibi) ve ekstrasellüler matriksten oluşmaktadır. Ventriküler kardiyak miyositler, total hücre sayısının üçte birini oluşturur ki bu da kalp kütlesinin %70-80'ine denk gelir (47,50). Memelilerde doğumda ya da doğumdan sonra kardiyak miyositlerin çoğu proliferasyon yeteneğini kaybettiği için, kalp büyümesi miyosit boyutundaki artışla gerçekleşir (51,52).

Miyositler miyofibril demetlerinden oluşmaktadır. Miyofibriller de kalbin kasılabilen ünitesi olan sarkomerin yapısında bulunan miyofilamentlerden oluşur. Miyositler sol ventrikülün civarında çevresel ve spiral olarak düzenlenir. Kalbin normal ritimde pompalama yapabilmesi için kasılmanın da aynı anda olması gerekir. Kardiyak miyositlerin bipolar uçlarında bulunan interkale diskler; komşu kardiyak miyositler arasındaki kasılma kuvvetini ileterek, hücre-hücre adezyonunun sürdürülmesini sağlar (53). Artan fonksiyonel yüklenmeye cevap verebilmek için kardiyak miyositlerinin büyümesi gerekir. Büyümede; sinyal yollarında aktivasyon, gen ekspresyonlarında değişiklikler, protein sentezinde ve kasılabilir proteinlerin sarkomerik ünitelere organizasyonunda artmalar görülür (Şekil 1). Kardiyak miyositler intrinsik mekano-sensitif bir mekanizmaya sahiptir. Kardiyak miyositlerin plazma membranında bulunan gerime duyarlı iyon kanalları ve yapısal proteinleri (integrinler gibi); ekstrasellüler matriks, sitoskeleton, sarkomer, kalsiyum taşıyan proteinler ve nükleus arasındaki bağlantıyı sağlamada önemli rol oynar (54,55).

Böylece hücre membranında bulunan integrinlerle kasılabilir yapılar ve nükleus arasındaki etkileşimin sürekliliği sağlanır (Şekil 1).



Şekil 1: Kardiyak hipertrofinin gelişimindeki hüresel aşamalar: ECM: Ekstrasellüler matriks, FAO: Yağ asidi oksidasyonu, GPCR: G proteiniyle eşleşen reseptör, MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz, PI3K: Fosfoinositid 3-kinaz, ROS: Reaktif oksijen türleri, SERCA: Sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPase (49).

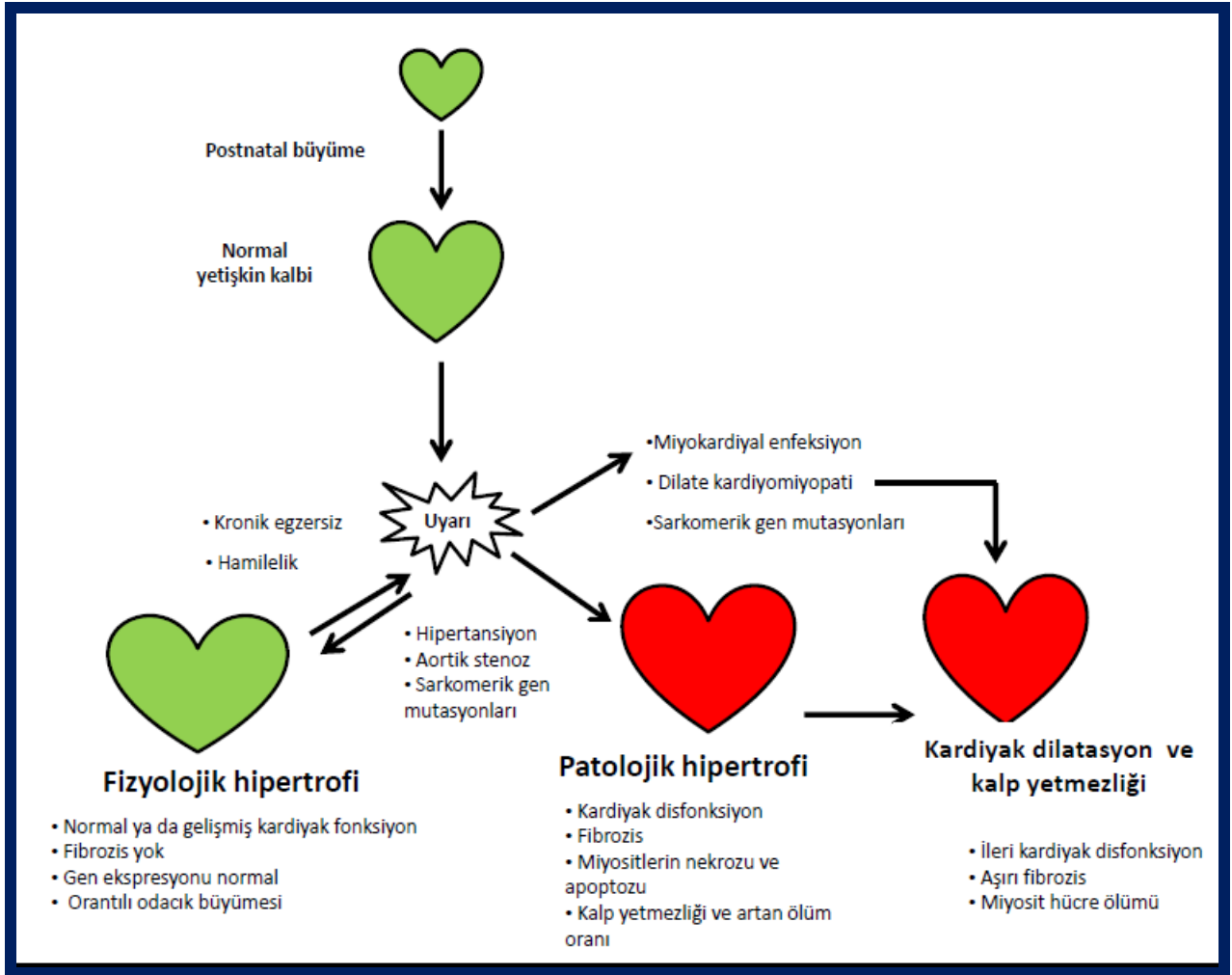
2.5.2 Sınıflandırılması (Fizyolojik ve Patolojik KH)

KH, fizyolojik ve patolojik olarak geniş bir şekilde sınıflandırılmaktadır. Fizyolojik kalp büyümesi; kavram olarak normal postnatal büyümeyi, hamilelik sürecinde oluşan büyümeyi ve egzersizin neden olduğu kalp büyümesini kapsamaktadır. Patolojik kalp büyümesi ise; kronik

olarak kan basıncının veya hacminin artmasına bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklarda (hipertansiyon ve kalp kapak hastalıkları vb), miyokard enfarktüsünde, iskemiyle ilgili koroner arter hastalığında ve kardiyomiyopatiye yol açan koşullarda (kalıtsal genetik mutasyonlar ve diyabet vb) görülmektedir (Şekil 2).

Hem fizyolojik hem de patolojik kalp büyümesinde kalbin boyutunda artış olurken, patolojik hipertrofide tipik olarak miyositlerin ve fibrotik elemanların kaybı, kalp yetmezliği riskinin artması ve ani ölüm görülmektedir (56).

Fizyolojik hipertrofide; kalp yapısı normal ya da gelişmiş olup, egzersize ya da hamileliğe bağlı olarak meydana gelen geri dönüşümlü değişiklikler görülür (57,58). (Şekil 2)



Şekil 2: Fizyolojik ve patolojik kardiyak hipertrofi (49)

Fizyolojik ve patolojik KH, konsantrik ya da eksentrik olarak alt gruplara ayrılarak sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma şekli, başlangıç uyarılarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Konsantrik hipertrofide; kalbin duvar kalınlığında ve kütlesinde bir artış görülürken, kalp odacıklarında ya küçük bir azalma ya da herhangi bir değişiklik görülmez. Sarkomerler paralel olarak eklendiği için miyositin hücre genişliğinde artma meydana gelir. Eksentrik hipertrofide; kalp kütlesinde ve kalp odacıklarında artma görülür. Duvar kalınlığı normal, azalmış ya da artmış olabilir. Sarkomerler seri olarak eklendiği için miyositin hücre uzunluğunda artma görülür (59).

Basınç artmasına neden olan patolojik uyarılar (hipertansiyon, aortik stenoz gibi) sistolik duvar stresinde artışa neden olarak konsantrik hipertrofiyle sonuçlanır (59). Hacim yüklenmesine sebep olan uyarılar (aort yetmezliği, arterio-venöz fistüller gibi) diyastolik duvar stresinde artmaya neden olarak eksentrik hipertrofiyle sonuçlanır (59,60). Klinik çalışmalardan elde edilen bilgilere göre patolojik uyarılarla oluşan eksentrik hipertrofinin, konsantrik kardiyak hipertrofiye göre daha fazla riske sahip olduğu belirtilmektedir (61).

Fizyolojik uyarı da konsantrik ya da eksentrik hipertrofiye neden olabilir. Aerobik egzersiz (dayanıklılık egzersizi, uzun mesafe koşusu gibi izotonik ya da dinamik egzersiz, yüzme) ve hamilelik, kalbe venöz dönüşü artırarak hacim yükselmesiyle sonuçlanır ve eksentrik hipertrofiye neden olur (47,62). Bu tip eksentrik hipertrofi, odacık genişlemesinde ve duvar kalınlığındaki oransal değişikliklerle karakterizedir. Oysaki hastalıklara bağlı olarak oluşan eksentrik hipertrofide, genellikle venrikül duvarında incelme görülür. Direnç egzersizinde (izometrik ya da statik egzersiz çeşitleri olan halter, güreş, ağır cisimleri atma vb egzersizlerde) kalpteki basınç artması, hacim artmasından daha fazla olduğu için konsantrik hipertrofi oluşur (47,60).

Fizyolojik ve Patolojik Kardiyak Hipertrofinin Farklı Özellikleri

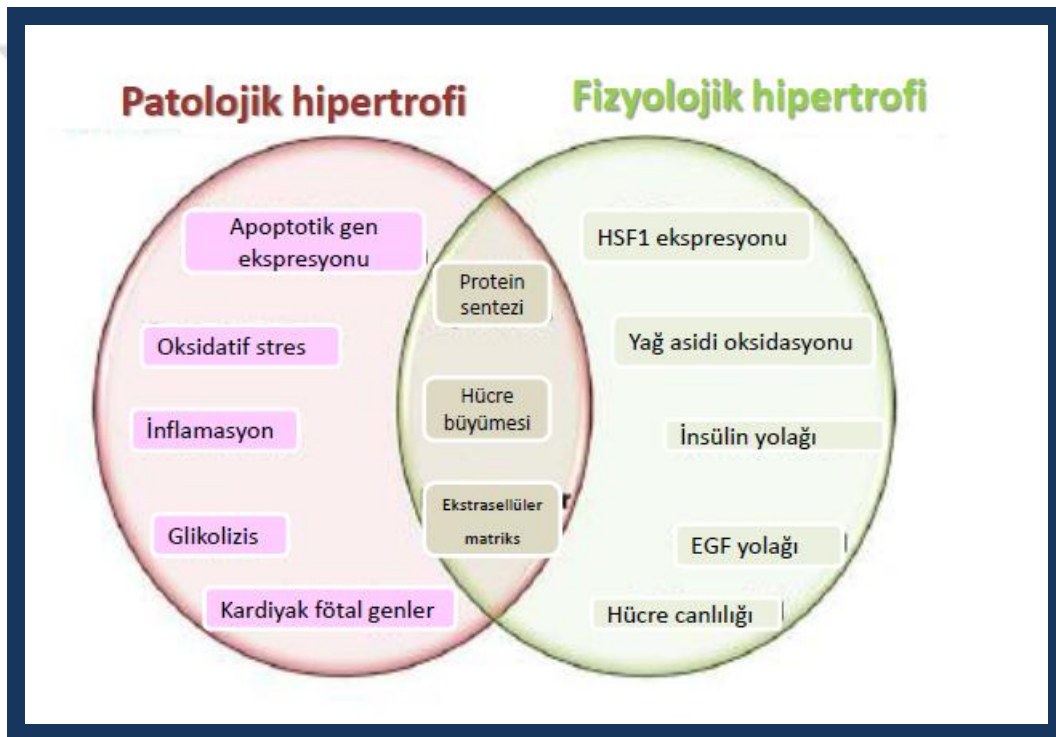
Fizyolojik ve patolojik kardiyak hipertrofinin ortak özelliği, kalbin ebatında görülen artmadır. Bunun dışında her iki hipertrofinin oluşumunda yapısal ve fonksiyonel, metabolik, biyokimyasal ve moleküller özellikler bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar tablo 1'de verilmektedir.

Tablo 1: Fizyolojik ve Patolojik Kardiyak Hipertrofinin Özellikleri (49)

Özellik	Patolojik Kardiyak Hipertrofi	Fizyolojik Kardiyak Hipertrofi
Uyarı	Hastalık Basınç ya da hacim artışı Kardiyomiyopati (ailevi, viral, diabet, metabolik, alkolik/toksik)	Aerobik egzersiz Postnatal büyüme Hamilelik
Kardiyak morfoloji	Miyosit volümünde artma Yeni sarkomerlerin oluşması Kalp ölçüsünde artma	Miyosit volümünde artma Yeni sarkomerlerin oluşması Kalp ölçüsünde artma
Kardiyak fibrozis	Var	Yok
Apoptozis	Var	Yok
Fötal gen ekspresyonu	ANP, BNP, β -MHC ve α -skeletal aktinin upregülasyonu	Relatif olarak değişme yok
Kontraktiliteyle ilgili genlerin ekspresyonu	SERCA2a ve α -MHC'nin downregülasyonu	Normal ya da artmış
Kardiyak fonksiyon	Deprese olmuş	Normal ya da artmış
Metabolizma	Yağ asidi oksidasyonunda azalma Glukoz kullanımında artma	Yağ asidi oksidasyonunda artma Glukoz kullanımında artma
Geriye dönebilme	Yok	Var
Kalp yetmezliği ve mortaliteyle ilgisi	Var	Yok

ANP: Atrial natriüretik peptid, BNP: B-tipi natriüretik peptid, β -MHC: β -miyozin ağır zincir, SERCA2a: Sarkoplazmik retikulum Ca²⁺ ATP-az 2a, MHC: Miyozin ağır zincir (49).

Fizyolojik ve patolojik hipertrofiyle ilgili yapılan mikroarray analizine göre tanımlanan ortak ve farklı eksprese olan gen kümeleri şekil 3'te gösterilmektedir. Patolojik hipertrofiyle ilgili genlerin büyük bir kısmı; inflamasyon, apoptoz, kardiyak fetal genler ve oksidatif stress kümelerinden oluşmaktadır. Fizyolojik hipertrofiyle ilgili genlerin ise; çoğunlukla hücrenin canlı kalma, yağ asidi oksidasyonu, insülin sinyal yolağı, epidermal büyüme faktör yolağı ve ısı şok proteini transkripsiyon faktörünün (HSF1) ekspresyonunda değişikliğe neden olmaktadır (63).



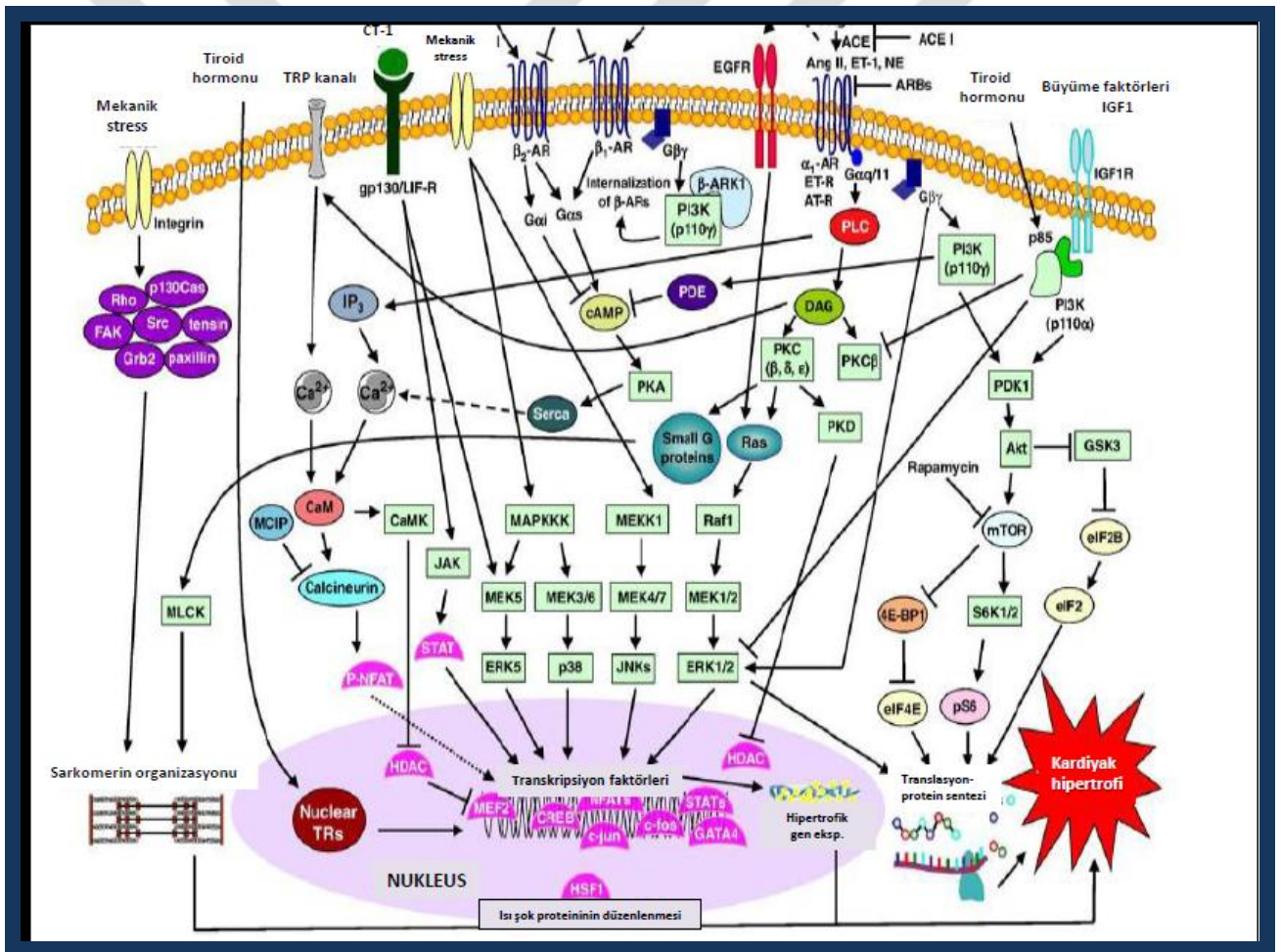
Şekil 3: Fizyolojik ve patolojik KH'de ortak ve farklı eksprese olan gen kümeleri (49).

2.5.3 Kardiyak Hipertrofiye Araçlık Eden Sinyal Yolakları

Mekanik strese maruz kalan kardiyak miyositler hemodinamik yüklenmeye cevap olarak; Anjiotensin II (Ang II), endotelin 1 (ET-1), insülin-like growth factor 1 (IGF1), transforming growth factor - β (TGF- β) ve kardiyotrofin 1 (CT-1) gibi otokrin ve parakrin faktörleri salar. Bu faktörler kardiyak hücrelerde bulunan reseptörlerine bağlanarak hücre içi sinyal yolaklarını aktive ederler ve böylece hücre büyümesi gerçekleşir. Fizyolojik ve patolojik hipertrofinin düzenlenmesinde proteinler ve sinyal yolakları farklı rol oynamaktadır (Şekil 4).

İnsan ve hayvan çalışmalarından elde edilen bilgilere göre; fizyolojik ve patolojik uyarıya yanıt olarak belli faktörler salınır. IGF1, egzersize cevapta ve postnatal gelişme esnasında salınan faktörlerden olup, (49) yüzme egzersizi yapan ratların kalplerinde IGF1'in seviyesinin arttığı gösterilmiştir (64). Profesyonel atletlerde kalbe özgü IGF1'in arttığı belirtilmektedir (65). Basınç yükselmesi; AngII, katekolaminler ve ET-1'in seviyesinde artmaya (66,67) ve kalp yetmezliği olan hipertrofik hastalarda AngII'nin oluşumuna neden olmaktadır (68).

Kardiyak hipertrofiye aracılık eden en iyi tanımlanan sinyal yolları; IGF1-fosfoinositid 3-kinaz (PI3K, (p110 α)) -Akt yolağı ve G α q sinyal yolağı (G proteiniyle eşlenik reseptörlerin (GPCR) AngII, ET-1 ve katekolaminlerin aktivasyonu ile downstream olması) olup şekil 4'te gösterilmiştir.

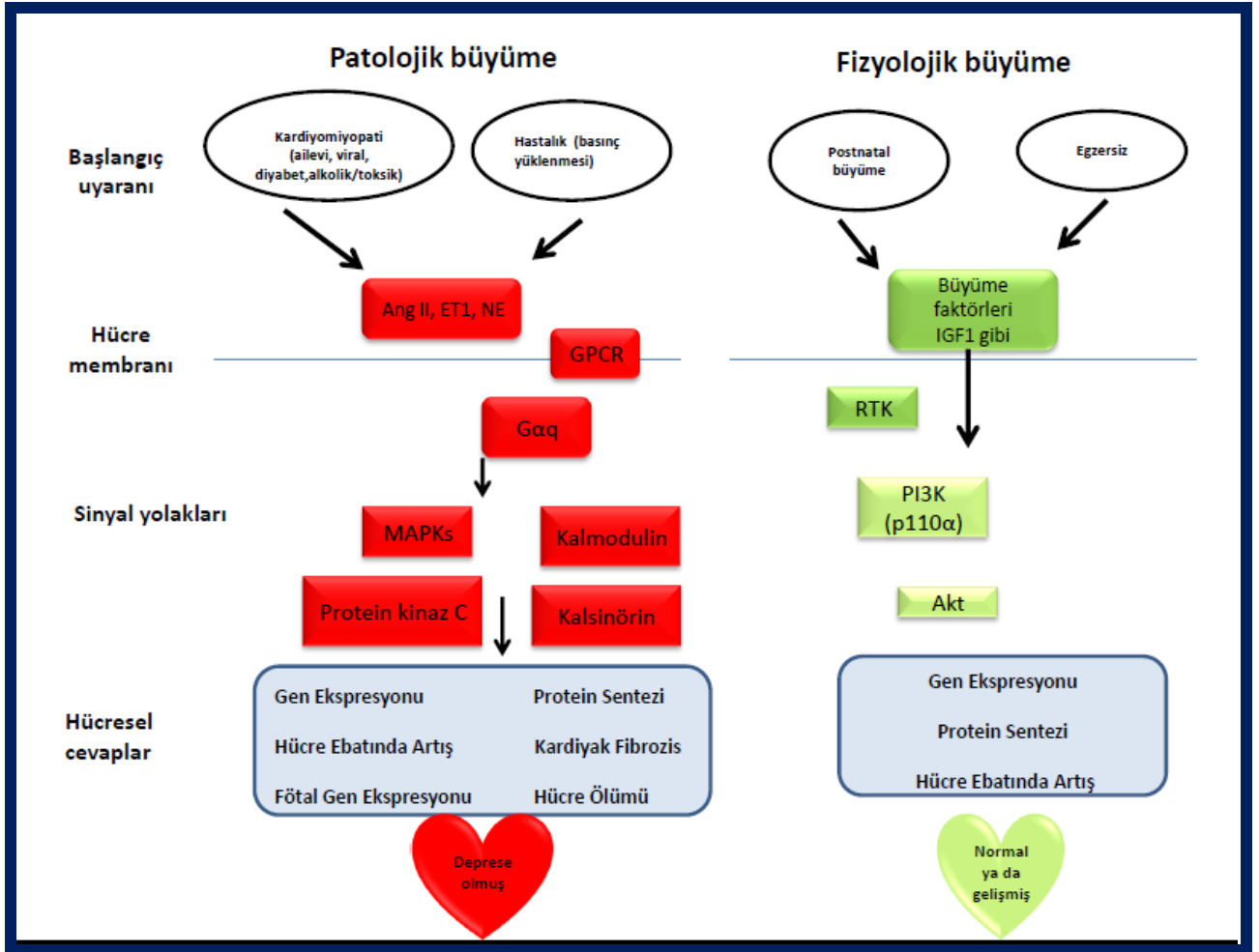


Şekil 4: Kardiyak hipertrofiye neden olan sinyal yollarının şematik gösterimi (49)

Fizyolojik kardiyak hipertrofiyle ilgili diğer sinyal yolları; gp130/JAK/STAT yolağı, tiroid hormon yolağı ve ısı şok proteini transkripsiyon faktör 1 (HSF1) yolağı olarak ifade edilmektedir. Patolojik hipertrofiyle ilgili anomalilerin PI3K (p110 γ), mitojenle aktive olan

protein kinazlar (MAPKs), protein kinaz C (PKC) ve protein kinaz D (PKD) ve kalsinörin yollarıyla ilgili olduğu belirtilmektedir (şekil 4).

Fizyolojik ve patolojik hipertrofi arasındaki farklılıkların ortaya çıkması; başlangıç uyarısında, sinyal yollarında, hücresel cevaplarda ve kalp fonksiyonunda görülen farklılıklara bağlı olarak gerçekleşmektedir (Şekil 5).



Şekil 5: Fizyolojik ve patolojik hipertrofi arasındaki farklılıkların gösterimi. Ang II: anjiyotensin II, ET-1: endotelin-1, GPCR: G proteiniyle eşlenik reseptör, IGF-1: insülin like-growth factor 1, MAPK: mitojenle aktive olan protein kinaz, NE: norepinefrin, PI3K (p110α): fosfoinosit 3-kinaz p110α, RTK: reseptör tirozin kinaz (49).

2.5.4 Tanı Kriterleri

Transtorasiik ekokardiyografi; insanlarda, sıçan ve tavşan gibi deney hayvanlarında yapısal ve fonksiyonel kardiyak değişiklikleri tanımlamada kullanılan güvenilir, non-invazif bir yöntemdir. Bu yöntem, sporcu kalbinin değerlendirilmesinde son derece önemli bir yere sahiptir (69).

Sporcu kalbinde ekokardiyografiyle saptanabilen yapısal değişiklikler; uygulanan egzersizin tipine, şiddetine ve sıklığına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Sporcu kalbinin gelişiminde egzersize ilave olarak; ırk, cinsiyet, yaş ve genetik faktörlerin de önemli rol oynadığı belirtilmektedir. Yüzme ve uzun mesafe koşusu gibi dayanıklılık (dinamik, izotonik ve aerobik) egzersizlerinde; sol ventrikül kavitesinde genişleme ve duvar kalınlığında artma görülmektedir. Güreş ve ağırlık kaldırma gibi germe (statik, izometrik ve anaerobik) egzersizlerinde ise, sadece sol ventrikül duvar kalınlığı artmaktadır. Sol ventrikül duvar kalınlığında en fazla artışa neden olan egzersizler; kürek, bisiklet ve kanoculuk olarak belirtilmektedir (1).

2.5.5 Sporcu Kalbi

Sporcu kalbi genellikle kalp kütlesinde benign bir artış olup, kronik egzersize fizyolojik adaptasyonu gösteren morfolojik değişikliklerle karakterize olan bir yapıya sahiptir.

Kardiyak hipertrofinin egzersize cevapta koruyucu olduğu ifade edilirken, bazı durumlarda kalp fonksiyonunu geliştirdiğı ve kalp yetmezliğini önlediğı kabul edilmektedir. Kardiyak hipertrofinin kalp yetmezliğinin oluşmasına neden olup olmadığını anlayabilmek için, hipertrofiden kalp yetmezliğine geçişten sorumlu olan moleküler mekanizmaların belirlenmesi son derece önem taşımaktadır.

Spor yapan bireylerde kalbin genişlemesiyle ilgili ilk gözlem İsveçli klinisyen Henschen tarafından 1890 yılında gerçekleştirilmiştir (70). Sporcular arasında kardiyak hipertrofinin farklı formlarının tanımlanması ise Mongaroth ve ark. tarafından 1975’de yapılmıştır (71). Non-invazif ve güçlü aletlerin gelişmesi hem kardiyovasküler çalışmalarda hem de sporcu kalbi üzerinde yapılan çalışmalarda artışa neden olmuştur.

2.6 GENOM

2.6.1 Tanımı

Bir organizmanın, en temel yapısı olan hücrenin sahip olduğu genetik materyalinin (gen kapsamına giren ve gen yapısı dışında kalan DNA bölgeleri) tümü genom olarak tanımlanmaktadır.

Genom bir organizmanın yapısı, işlevleri, işlevlerinin devamlılığı ve gelecek nesillere aktarılabilmesi için gerekli olan biyolojik bilginin tümüne sahiptir.

2.6.2 Yapısı

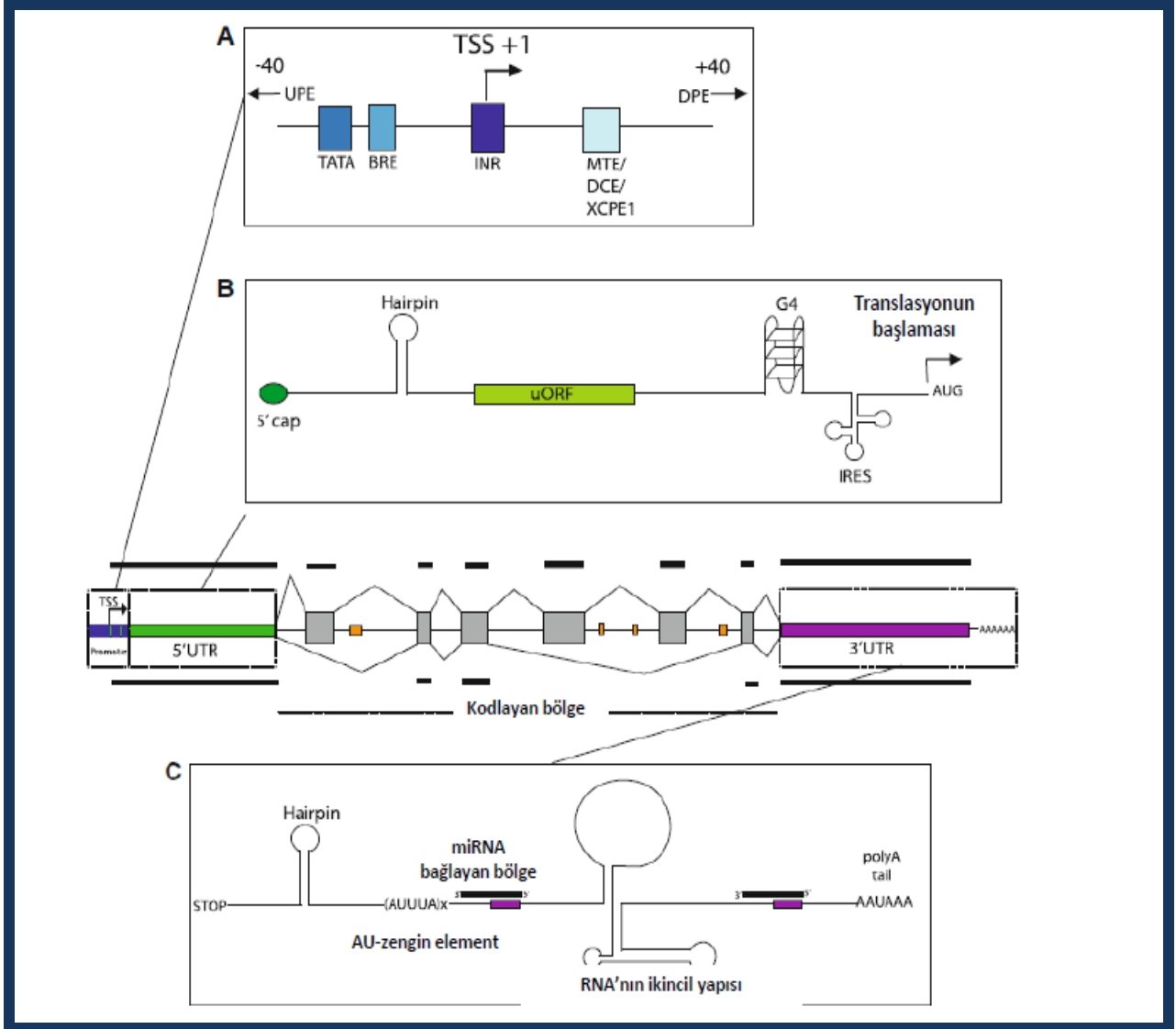
Karşılaştırmalı genomik çalışmalardan elde edilen verilere göre, bir genomun protein kodlayan bölgesindeki gen sayısının yüksek organizasyona sahip olan canlılarda daha fazla olduğu bilinmektedir (72). Ancak genomun kodlamayan bölgesinde bulunan transkriptlerin sayısının, protein kodlayan bölgede yer alan genlerin sayısından ve çeşitliliğinden daha fazla olduğu gözönüne alındığında; genomik bilginin içeriğinin yeniden değerlendirilmesi gündeme gelmiştir (73).

İnsan genomunun %80'den fazlası transkribe olurken, genomumuzun sadece %2'lik kısmı protein kodlayabilme kapasitesine sahiptir. Kodlamayan genomun çeşitliliği, incelenen organizmanın fonksiyonel karmaşıklığı ile yakından ilgilidir (72). Kodlamayan genomun yapısında çok sayıda kodlamayan RNA'lar bulunmaktadır. Kodlamayan RNA'lar, gelişim sürecinde ve hastalıklarda yer alan moleküler ağların yapıtaşları olarak görev yapmaktadır (73).

2.6.3 Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Yüksek organizasyona sahip ökaryotik canlılarda gen ekspresyonunun düzenlenmesinde çok sayıda faktör yer almaktadır. Bir genin yapısında 5' ve 3' untranslated gen bölgeleri (UTR'lar) ve intronlar bulunmaktadır. Bu bölgelerin gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan majör kısımlar olduğu ifade edilmektedir (Şekil 6). Yıllarca DNA'nın intergenik bölgelerinin "değersiz" olduğu kabul ediliyordu. Ancak son zamanlarda bu bölgelerin gen ekspresyonunun kontrol edilmesine önemli katkılarının olduğu görülmüştür (73,74). Kodlamayan dizilerde görülen

varyasyonların bireyler ve türler arasında ortaya çıkan fenotipik farklılıklara neden olduğu belirtilmektedir (75).



Şekil 6: Kodlamayan gen bölgesindeki düzenleyici elementler. Merkezdeki şekil tipik bir geni göstermektedir (Ekzonlar gri renkle gösterilirken, turuncu renkteki dikdörtgenler ise intronik enhanser elementleri göstermektedir). **A. Promotor bölgesi düzenleyici elementler:** Upstream ve downstream promotor elementleri kor promotor bölgesinin dışında yerleşmiş olup oklarla gösterilmektedir. **B. 5' UTR'da bulunan düzenleyici elementleri göstermektedir.** **C. 3'UTR'daki düzenleyici elementleri göstermektedir (77).**

2.6.3.1 Promotor

Ökaryotik promotor DNA'nın düzenleyici bölgesi olup, genin upstream bölgesinde yer almakta ve transkripsiyon faktörü II D'yi (TFIID) bağlamaktadır. Böylece transkripsiyon başlama kompleksinde bulunan yapıların koordinasyonunu sağlayarak ve RNA polimeraz II'nin temin edilmesini kolaylaştırarak görev yapmaktadır (76,77). Kor promotor genellikle ~ 80 bp transkripsiyon başlama bölgesi (TSS) içermekte ve 2 farklı sınıfa ayrılabilir. Korunmuş TATA kutusu içeren promotorlar tek bir TSS'de transkripsiyonu başlatabilirken, CpG açısından zengin olan promotorlar ise çok sayıda TSS içermektedir (78). Promotora bağlanan çok sayıda motif bulunmaktadır. Böyle kompleks promotorların yapısında enhanserlar, upstream ve downstream promotor elementleri (UPE ve DPE) bulunmaktadır. Bu elementler transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesini içerdiği için transkripsiyonun başlamasını kolaylaştırır. Kompleks promotorlarda genellikle B-tanım elementleri (BRE) bulunur ki bu element TFIID'yi tanıyarak RNA polimeraz II'nin bağlanmasına ve başlatıcı elementlerin (INR) tanınmasına yardımcı olur. TATA-kutusu promotörü TFIID aracılığıyla bağlanmaktadır (76,77). Diğer elementler insulator, aktivator, represör içerirken daha nadir olarak da motif ten element (MTE), downstream kor element (DCE) VE X-kor promotor element 1 (XCPE1) içerebilir. Bu elementler promotor aktivitesine katkıda bulunan elementler olarak tanımlanmaktadır (Şekil 6-a) (76). Kor elementler buldukları pozisyona göre promotor aktivitesini pozitif ya da negatif olarak etkiler.

2.6.3.2 5' Untranslated Bölge (5' UTR)

Protein kodlayan genlerin 5' ucunda bulunan ve DNA'nın düzenleyici bölgesi olan untranslated bölge (UTR), mRNA'ya transkribe olur ancak proteine dönüşmez. 5' UTR çeşitli düzenleyici elementler içerir (Şekil 6-B) ve translasyonun başlamasının kontrolünde önemli rol oynar.

5' UTR'da bulunan yapılardan birisi cap'tir (Şekil 6-B). 5' cap, prekürsör mRNA'nın 5' ucunda bulunan ve 7-metil guanozin içeren bir yapıya sahiptir (79). Bu yapı mRNA'nın translasyonu için gereklidir. Çeşitli ökaryotik translasyonu başlatan faktörlerin (eIF) bağlanmasında, 40S ribozomal alt ünitesinin bağlanmasının teşvik edilmesinde ve diğer

proteinlerin biraraya gelerek 43 S'lik erken başlatma kompleksinin (PIC) oluşumunda görev yapar (80). Ayrıca 5' cap yapısı mRNA'nın stabilizasyonunu sağlar.

5' UTR'da bulunan bir diğer yapı da internal ribozom entry (IRES)'dir (Şekil 6-B). IRES, mRNA düzenleyici bir motif olup, translasyonun başlamasını cap'den bağımsız bir mekanizmayla kolaylaştırır. IRES, stres koşullarında cap-bağımlı translasyon inhibe edildiğinde normal hücrel fonksiyonların devam edebilmesi için gereklidir. Ayrıca IRES, ribozomlara cap yapısının eklenmesine izin verir (81).

2.6.3.3 ORF (Açık Okuma Çerçevesi)

5' UTR'da bulunan upstream açık okuma çerçevesinde bulunan upstream AUG kodonu, ana başlama kodonundan önce yer alır (82,83,84) (Şekil 6-B). uORF'ler; 5'UTR'ın yaklaşık %50'sinde bulunmakta olup, protein ekspresyonunu azaltır. uORF, mRNA seviyesini %30 ve protein ekspresyonunu ise %30-80 oranında azaltır (85). Ribozomun AUG'ye bağlanmasıyla yeni bir okuma çerçevesi oluşabilir. Ana okuma çerçevesinin başlangıcında bulunabilir ya da translasyonun etkinliğinin değişmesiyle downstream ekspresyonu etkileyebilir.

2.6.3.4 İntronik bölgeler

İntronlar ön haberci mRNA'ya (pre-mRNA) transkribe olan DNA bölgeleri olup, splicing (kesip-çıkarma) sırasında olgun bir mRNA oluşturmak için ortadan kaldırılır (Şekil 6). Yani alternatif splicinge katkıda bulunur. İntronlar, kodlayan bölgede krosingover oranını artırarak protein seviyesinde farklılaşmayı sağlayarak evrimsel çeşitliliğe katkıda bulunur. Transkripsiyonu düzenleyen elementlerin taşınmasına ve hızlı değişimine neden olur. Protein ekspresyonuna katılmayan RNA'ların düzenleyici bölgelerinin evrimsel olarak korunmasını sağlar. mRNA'nın nukleustan taşınması ve yıkılması için sinyallerin verilmesine neden olur. Transkripsiyon ve translasyonun ayrılmasına neden olarak önemli farklılıkların ortaya çıkmasını sağlar.

İntronlar gen ekspresyonunu negatif olarak etkilemektedir. İntronun organizasyonuna, pozisyonuna ve uzunluğuna bağlı olarak gen ekspresyonunda değişiklikler görülür. İnsan geni

ortalama 5-6 intron içermekte ve ortalama uzunluğu 2.100 nükleotitden oluşmaktadır. İnsanlarda ve diğer hayvanlarda intronun uzunluğu genelde transkript seviyesiyle tersine ilişkilidir.

2.6.3.5 Düzenleyici elementler: Enhanserlar

Enhanserlar DNA segmentleri olup, genlerin transkripsiyonunu artırmaktadır. Transkripsiyon faktörlerine bağlanarak promotorla birleşir (86). Enhanserlar downstream süreçleri de etkileyebilir (kromatin fibrillerinin gevşemesi gibi). Bu elementler özellikle promotorla etkileşmelerinin dışında; upstream, downstream ve distal elementlerin promotordan bağımsız olarak transkripsiyonu aktive edebilir. Enhanserlar transkripsiyonun ana düzenleyici elementleri olup, birçok enhanserin, genlerin ekspresyon paternlerini tanımlamada önemli rol oynamaktadır (87).

2.6.3.6 3' Untranslated bölgesi (3' UTR)

3' untranslated bölgesi (3' UTR), protein kodlayan dizinin downstreamine yerleşerek gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel seviyede düzenlenmesini sağlayan bölgeler içermektedir (Şekil 6-C). 3' UTR'da bulunan düzenleyici bölgeler; mRNA'nın stabilitesini, lokalizasyonunu, poliadenilasyonu ve translasyonun etkinliğini belirlemektedir. Memeli genomunda bulunan korunmuş bölgelerin çoğu 3' UTR'da yer almaktadır. 3' UTR çok sayıda düzenleyici protein için de bağlanma bölgesi oluşturmaktadır (88) (Şekil 6-C).

2.6.3.7 Poly A tail

Poly A tail, RNA molekülünün 3' ucuna bir seri adenozin bazının eklenmesinden oluşur (Şekil 6-C). mRNA'nın poly A bölgesine bağlanan proteinler (PABP); gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, mRNA'nın taşınmasında, stabilitesinde, yıkımında ve translasyonunda önemli rolleri bulunur (89,90). PABP'ler çeşitli faktörlerin bağlanmasını sağlayarak gen ekspresyonunu indirekt olarak düzenler (91). Poly A tail, memeli hücrelerinde yaklaşık 250 baz çifti uzunluğunda sentezlenmekte olup, stoplazmaya geçtiğinde kısalarak translasyonu baskılamaktadır (92).

2.7 MikroRNA'lar

2.7.1 Tanım

MikroRNA'lar (miRNA) endojen, korunmuş, tek zincirli, küçük (yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda), kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar hedefleri olan haberci RNA (mRNA)'lar aracılığıyla gen ekspresyonunu post-trankripsiyonel seviyede düzenlemektedir (93).

miRNA'ların ilk keşfi 1993 yılında Victor Ambros ve arkadaşları Rosalind Lee ve Rhonda Feinbaum tarafından *C. elegans* adlı nematodda larval gelişimin süresini kontrol eden bir gen olan lin-4 geninin keşfiyle başlamıştır. Lin-4 geni, erken gelişim döneminde birinci larval dönemden ikinci larval döneme geçişi teşvik eder (94). Bu gen, mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanır ve protein ekspresyonunu inhibe ederek gelişimin düzenlenmesini sağlar (95,96). Lin-4 geni keşfedildikten yedi yıl sonra *C. elegans*'da bir başka gen olan let-7 geni keşfedildi. Let-7 RNA'sı geç larval dönemden yetişkin döneme geçişi teşvik eden bir gendir (94). Daha sonra insan ve *Drosophila* genomlarında let-7 geninin homologları tanımlandı (97). Bir yıldan daha kısa bir sürede uçan canlılarda, solucanlarda ve insanlarda alınan küçük RNA'lar klonlanmıştır. Zayıf kodlamayan RNA'larda toplamda 100'den fazla yeni genin bulunduğu rapor edilmiştir (98).

İnsanlardan ve diğer türlerden elde edilen bütün miRNA'lar miRBase adlı bilgi bankasında yer almaktadır. miRBase'de 223 türde 35.828 olgun miRNA ürününün eksprese olduğu belirtilmektedir (99). Bu miRNA'lar arasında insan genomunda 2.588 olgun miRNA dizisi kodlanmakta olup, bu miRNA'lar protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'ını hedeflemektedir (100). Her bir miRNA geni, 10'dan 100'e kadar farklı hedef genin düzenlenmesini sağlamaktadır (101). miRNA'lar, protein kodlayan hedef mRNA genlerinin 3' UTR'ında bulunan komplementer dizilere bağlanarak mRNA'nın parçalanmasına ya da translasyonun baskılanmasına neden olmaktadır (102). miRNA'nın 5' ucunda 7-8 nükleotidlik hedef mRNA'nın komplementeri olan seed bölgesi bulunmaktadır (103). miRNA ya translasyonu inhibe eder ya da hedefi mRNA'nın degradasyonuna neden olabilir veyahut her ikisini birlikte yapabilir. Bu durum bağlanma bölgelerinin sayısına ve bu bölgelerle olan komplementerlik ilişkisine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (104). Beklenen hedef RNA'yla komplementer olan miRNA; hedef mRNA'yı degrade ederken, hedef mRNA'ya tam komplementer olmayan diziler ise translasyonun inhibisyonuna neden olmaktadır (103).

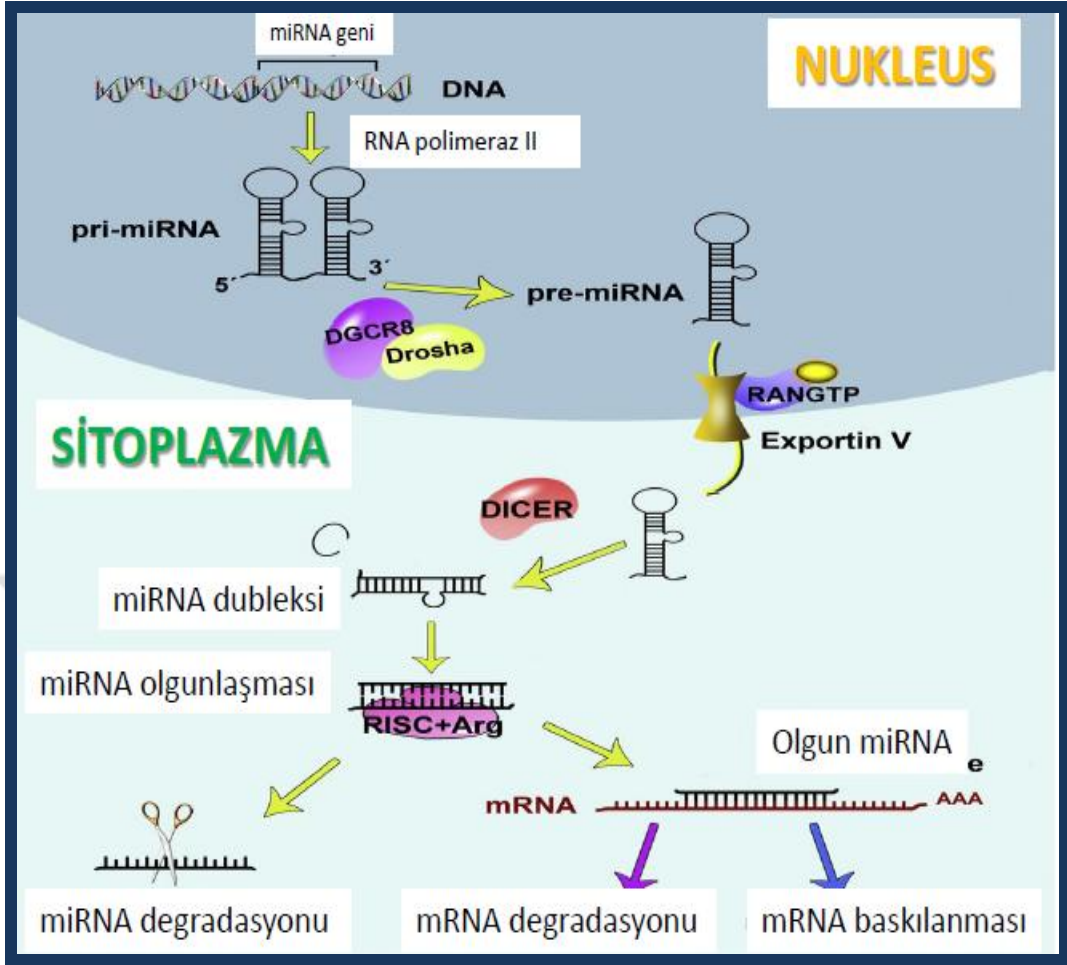
2.7.2 Biyogenezi ve Fonksiyonları

miRNA'ların biyogenezi miRNA genlerinin transkripsiyonuyla başlamaktadır (Şekil 7). Öncelikle miRNA'lar nukleusta RNA polimeraz II tarafından transkribe olarak binlerce baz uzunluğunda, cap ve poliadenil yapılarını içeren primer transkriptleri (pri-miRNA) oluşturur (105). Bu pri-miRNA'lar katlanarak hairpin yapısı oluşturarak tam olmayan baz eşleşmelerine neden olur. RNAaz III endonükleaz olan Drosha ve çift zincirli RNA bağlayan Pasha (DiGeorge kritik bölge 8 (DGCR8) proteini olarak bilinir) olarak adlandırılan nükleer mikroprosesör kompleksleri aracılığıyla kesilerek, hairpin yapısında 70-100 nükleotidlik preliminary-miRNA'ları (pre-miRNA) oluşturur (106).

pre-miRNA'lar nukleustan stoplazmaya RANGTP ve exportin 5 taşıyıcıları aracılığıyla taşınır. Taşındıkları yerde diğer bir RNAaz III enzimi olan Dicer tarafından işlenir (107). Dicer aracılığıyla pre-miRNA'lardan 18-24 nükleotidlik geçici dubleksler oluşur. Bu dubleks yapıya Argonaute proteini içeren miRNA ile ilgili multi-protein RNA-induced silencing complex (RISC) eklenir (108). Bu aşamada çift zincirli miRNA'lardan biri olgun olarak seçilirken, diğeri star zincir olarak adlandırılır ve hızlı bir şekilde degrade olur (109).

Olgun miRNA'lar gen ekspresyonunu negatif olarak düzenlemektedir. miRNA'lar bu düzenlemeyi hücre içinde ya translasyonu baskılayarak ya da mRNA'nın degrade olmasını sağlayarak gerçekleştirmektedir (110).

Bazı intronik miRNA prekürsörleri Drosha aşamasını geçerek Dicer prosesine uğradığında oluşan miRNA'ların alternatif bir yolağı temsil edebileceği ifade edilmektedir (111).



Şekil 7 : miRNA biyosentezinin şematik gösterimi (112)

2.7.3 Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde miRNA'ların rolü

miRNA'lar; homeostatik koşullar altında gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Strese maruz kalındığında ya da hastalık proseslerinde miRNA'ların düzenleyici rolü çok daha önemlidir.

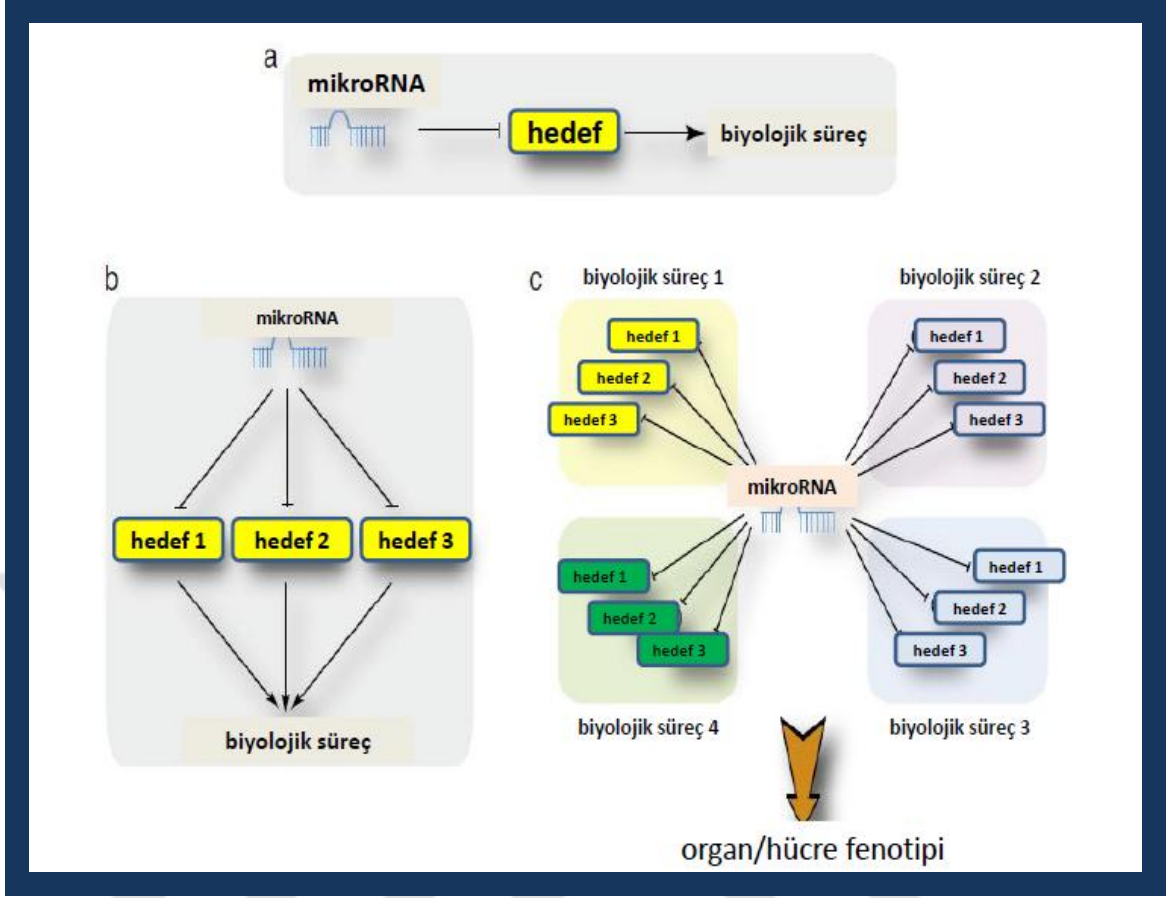
miRNA'ların hedeflerinin tanımlanmasında kısa dizi parçalarında meydana gelen baz eşleşmelerinden yararlanır. Potansiyel miRNA'ların hedeflerini belirlemek için çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir. Bu algoritmaların geniş listelerinde çok sayıda yanlış pozitif hedeflerin bulunması hücresel ağ bilgilerinde gereksiz bilgilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (113).

Önceden yapılan çalışmalarda bir miRNA'nın tek bir hedef geninin olduğu ve bu hedef geni aracılığıyla tek bir biyolojik süreçten sorumlu olduğu ifade ediliyordu (Şekil 8-a).

Daha sonra yapılan çalışmalarda biyolojik süreçlerde yer alan miRNA'ların birden fazla hedefinin olduğu ve miRNA'nın bu hedeflerini inhibe ederek gen regülasyonunu düzenlediği belirtilmektedir (Şekil 8-b).

Daha kompleks bir seviyeden bakılırsa, tek bir miRNA geninin birden fazla biyolojik süreci içeren düzenleyici ağların oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Şekil 8-c). miRNA temelli ağların hücreSEL davranışları nasıl kontrol ettiğini gösterebilmek için DNA, RNA ve protein üzerindeki etkilerini gösteren teknikler kullanılmaktadır. Kullanılan bu tekniklerle ilgilenilen ağların kombinasyonlarından yararlanmak son derece önemlidir (114).

miRNA'ların hedef genlerini ve yer aldıkları sinyal yollarını belirlemek için çeşitli bilgi bankaları kullanılmaktadır. Bu bilgi bankalarından en yaygın olarak kullanılanları; miRBase, miRwalk, Qiagen Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 'dir (99).



Şekil 8: miRNA temelli gen ekspresyonu düzenlenmesinin farklı modelleri (115).

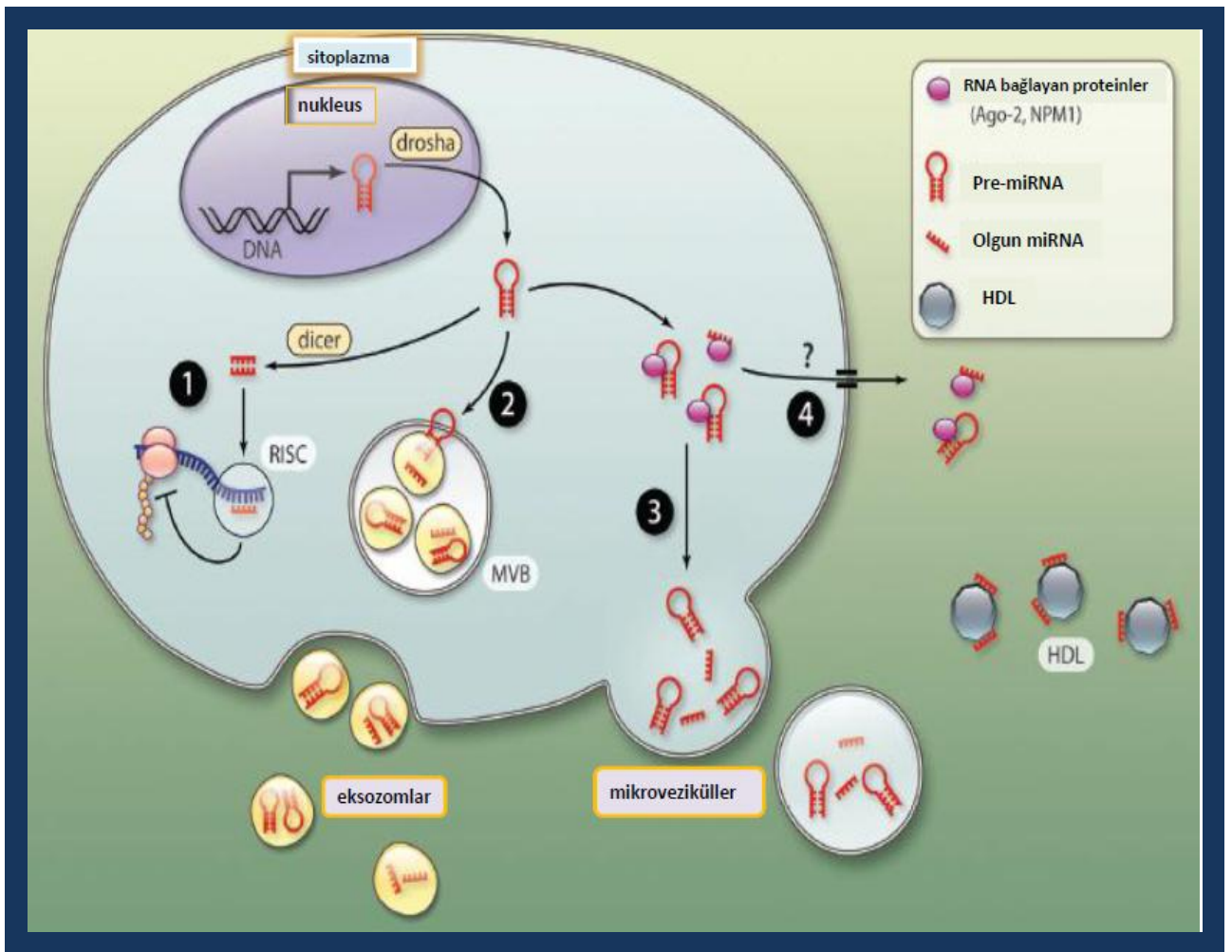
miRNA'lar kardiyovasküler sistemde yüksek oranda eksprese olmasına rağmen (116), memeli kardiyovasküler sisteminde miRNA'ların biyolojik rolü 2005 yılından beri bilinmektedir (117).Yapılan çalışmalara göre miRNA'ların sadece kardiyovasküler gelişmede değil aynı zamanda kardiyovasküler hastalıklarda da rol aldığı belirtilmektedir (118).

2.7.4 Dolaşımda Bulunan miRNA'lar

Kanda bulunan miRNA'lar 2008 yılında keşfedilmiştir. Dolaşımdaki miRNA'ların plazmada, trombositlerde, eritrositlerde ve nukleuslu kan hücrelerinde bulunduğu saptanmıştır. Plazmada bulunan miRNA'lar stabil formda oldukları için miRNA'ların kaynatmaya, düşük ya da yüksek pH'ya, oda ısısında uzun süre saklamaya ve tekrarlayan dondurup-çözmeye karşı dayanıklı

oldukları belirtilmektedir (119,120). Dolaşımda bulunan miRNA'ların konsantrasyonları çok düşüktür. miRNA'lar dolaşıma salındıktan sonra RNaz aracılığıyla degradasyona uğrar. Salınımı ve korunmalarını sağlayan mekanizmaların anlaşılmasıyla birlikte miRNA'ların potansiyel biyolojik özellikleri hakkında bilgi edinilecektir.

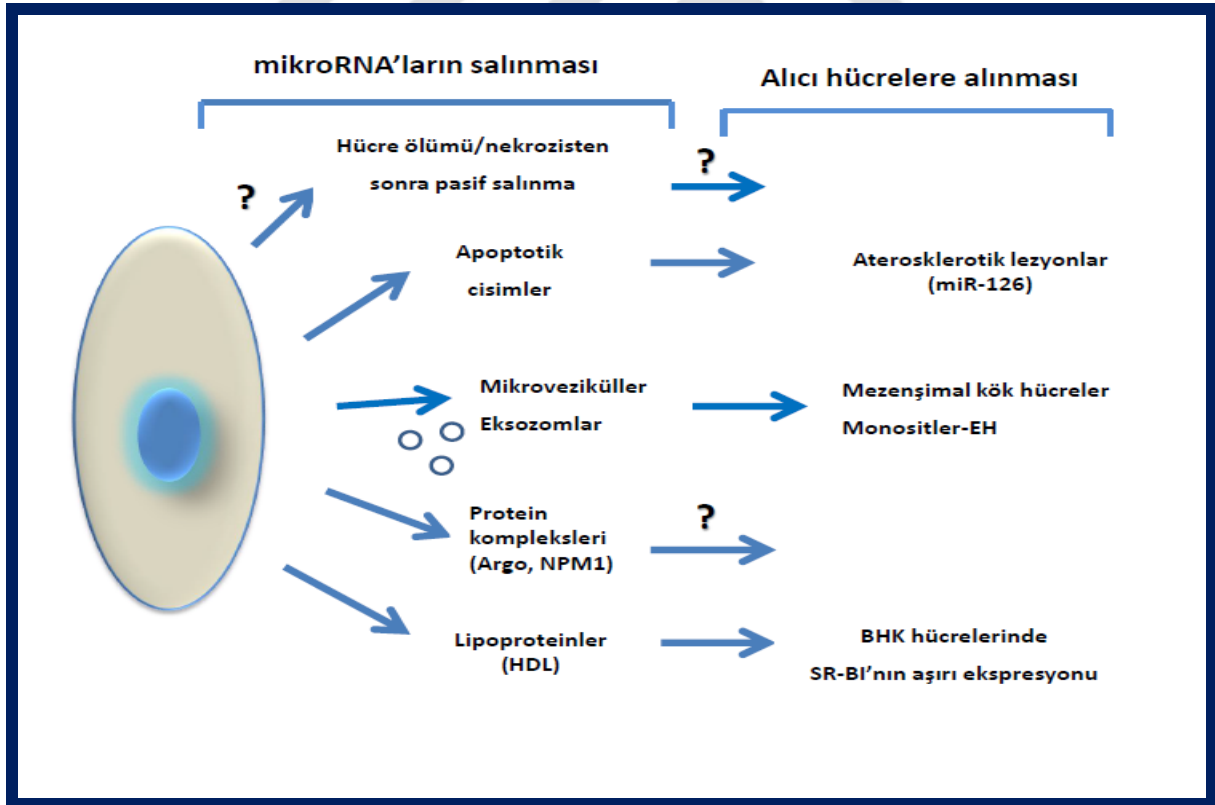
miRNA'ların çeşitli mikropartiküllerde (eksozom, mikrovezikül ve apoptotik cisimler) ya da RNA bağlayan proteinlerde (Argonaute 2) ya da lipoprotein komplekslerinde (yüksek yoğunluklu lipoprotein: HDL) degradasyondan korunmak için paketlenedikleri belirtilmektedir (Şekil 9).



Şekil 9: miRNA'ların hücresel salınma mekanizmaları ve ekstrasellüler taşıma sistemleri (121).

El-Hefnay ve ark. plazmada bulunan RNA'ların degradasyondan korunmak için protein ya da lipid veziküllerine katıldığını ilk defa göstermiştir. Eksozomlar 50-100 nm büyüklüğünde küçük veziküller olup, endozomdan köken alır ve multiveziküler cisimler (MVB) plazma membranıyla birleştiğinde hücrelerden salınır. Mikroveziküller eksozomlardan daha büyük (0.1-1 µm) membran vezikülü olup, plazma membranında bulunan çıkıntılar aracılığıyla hücrelerden salınır. Apoptotik cisimler, apoptoz esnasında hücrelerden dökülen ve 0.5-2 µm boyutunda en büyük mikropartiküllerdir (121).

miRNA'ların depo edildikleri yerler, salınmaları ve alıcı hücreler tarafından alınmalarıyla ilgili farklı hipotezler ortaya atılmıştır. Bu hipotezlerden birine göre, miRNA'ların lipid veziküllerinde depolandığı, apoptotik hücre ölümünden sonra salınan miRNA'ların aterosklerotik lezyonlarda biriktikleri ifade edilmektedir. miRNA'ların mikroveziküllere, mezenşimal kök hücrelerine ve monosit-endotel hücrelerine de alınabildikleri belirtilmektedir. miRNA içeren mikroveziküllerin salınmasıyla miRNA'ların alıcı hücreye alınarak gen ekspresyonunu düzenlemektedir.



Şekil 10 : MikroRNA'ları degradasyondan koruyan mekanizmalar: **EC**: Endotelial hücreler, **HDL**: Yüksek dansiteli lipoprotein, **Argo**: Argonaute, **NPM-1**: Nükleofosmin-1, **SR-B1**: Scavenger reseptörü B sınıfı üyesi 1, **BHK**: Bebek hamster böbreği (122)

Kardiyovasküler araştırmalarda serumda ya da plazmada kolay bir şekilde ölçülebilecek güvenilir bir belirtecin tanımlanması son derece önem taşımaktadır.

2.7.5 Kardiyovasküler Sistemin Gelişiminde miRNA'lar

Memeli embriyogenezi esnasında ilk oluşan organ kalptir. Anterior mezodermin primer kalp alanında bulunan mezodermal öncüller, ventromediyal olarak göç ederek lineer kalp tüpünün şekillenmesine neden olur. Mezodermal kardiyak öncüllerin ikinci grubu ikinci kalp alanı olarak bilinmekte olup, faringeal mezodermden köken alır ve primer kalp alanının mediyal ve anterior kısmına yerleşir. Bu hücreler kalp tüpünün arkasından göç ederek kalp tüpünün anterior ve posterior kutuplarına gelir. Düzgün olmayan büyüme ve yeniden yapılanmaya bağlı olarak kalp tüpünün sağa doğru katlanmasıyla primitif ventriküllerin ve atriyumların oluşmasına yol açar. Daha yüksek organizmalarda kalbin olgunlaşması; bölümlere ayrılmasıyla ventriküllerin ve atriyumların oluşumuna, kapakların oluşumuna ve kan damarlarının çıkışına neden olmaktadır. Primer kalp alanındaki hücrelerin çoğu sol ventriküle, bir kısmı da sağ ve sol atriya katkıda bulunur. İkinci kalp alanı sağ ventrikülün çıkış yolunun büyük bir kısmına ve atriyumların ise bir kısmına katkıda bulunur (123,124). Kardiyak nöral krest hücreleri dorsal nöron tüpünden çıkış yolunun içine doğru göç etmektedir (125).

2.7.5.1 miR-1/ miR-133 ailesi

miR-1 ve miR-133a'nın ekspresyonu kalp ve iskelet kasına özgü olarak gerçekleşir. miR-1/miR-133'ün kalp kasındaki transkripsiyonu serum response factor (SRF) tarafından düzenlenir (126,127) (Şekil 11). Kardiyomiyositlerde SRF, miR-1/miR-133'ün enhanser bölgelerine bağlanarak miRNA ekspresyonunu düzenlemektedir. miR-1/miR-133 aile üyeleri kalbin gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Gelişen kalpte miR-1'in aşırı ekspresyonu; ventriküler kardiyomiyosit proliferasyonunda azalmaya, ventrikül duvarında incelmeye ve sonuçta kalp yetmezliğine neden olmaktadır (127).

miR-1'in önemli hedeflerinden biri Hand2 olup, ventriküler kardiyomiyosit gelişiminde yer alan bir transkripsiyon faktörüdür (127). Hand2 geninde delesyon olan farelerin embriyolarında, embriyonik yaşamın 10,5. günde kalp yetmezliğine bağlı ölüm görülür (128). miR-1-2, kardiyak morfogenezi, elektriksel ileti ve kardiyak hücre siklusunun kontrolünü

düzenlemektedir. 3' UTR'da SRF ve Cyclin D2 miR-133a için fonksiyonel bağlanma bölgeleri içerir. Bu bulgular miR-133a-1 ve miR-133a-2'nin kalp gelişiminde, gen ekspresyonunda ve kalbin fonksiyonunun düzenlenmesinde son derece önemli rolünün olduğunu gösteren işaretlerdir (129).

Yetişkin kemirgen ve insanların kalbinde miR-1 ve miR-133'ün değişen ekspresyonlarının kalp yetmezliğiyle ilgili olduğu belirtilmektedir (130). miR-133; protein sentezini, fetal gen ekspresyonunu ve atrial natriüretik faktörün perinükleer ekspresyonunu artırarak miyosit hipertrofisine neden olmaktadır.

İnsülin-like growth faktör 1 (IGF-1)/İnsülin-like growth faktör 1 reseptörü sinyal yolağı kalp kasının büyüme yönlendirilmesinde ve fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır. IGF-1 ve IGF-1 reseptörü miR-1'in hedefleridir. Foxo3a; IGF-1 sinyal yolağının bir bileşeni olup, miR-1'in ekspresyon seviyesini transkripsiyonel olarak düzenlemektedir (131).

2.7.5.2 MyomiRler: miR-208a, miR-208b ve miR-499

MyomiRler miR-208a, miR-208b ve miR-499 olup; sırayla Myh6, Myh7 ve Myh7b genlerinin intronlarında bulunur (132). miR-208a'nın hedefinin delesyonu kalpteki hızlı iskelet kasının ektopik aktivasyonuna neden olarak, kardiyak hipertrofi ve miyokardiyal fibrozise karşı korumaktadır. miR-208a eksik olan farelerde kardiyak strese cevapta gerekli olan β -MyHC ekspresyonu upregüle olmamıştır. Buradan yola çıkılarak miR-208a'nın embriyogenezde ve kalp gelişiminde gerekli olmadığı belirtilmektedir (133). Yetişkin fare kalbinde sistemik olarak anti-mirin uygulanmasıyla miR-208a inhibe edilerek; patolojik miyozin değişikliğinin oluşması önlenmiş ve kardiyak yapılanmanın yeniden düzenlenmesiyle kalp fonksiyonunun devam ettirilmesi sağlanmıştır (134). miR-208b ve miR-499 ise yavaş miyofibrilleri aktive edip hızlı miyofibrilleri baskılayarak kas fibrillerinin özelleşmesini sağlamaktadır (132).

2.7.5.3 miR-17/92 grubu

miR-17/92 grubunda; miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b ve miR-92a'dan oluşan 6 adet miRNA bulunmaktadır (135).

Fonksiyon kaybı çalışmaları miR-17/92 grubunun kalbin gelişiminde kritik bir rolü olduğunu açığa çıkarmıştır. miR-17/92 mutantlarının doğumdan kısa bir süre sonra öldüğü ve bunlarda ventriküler septal defekt olduğu belirtilmektedir (135).

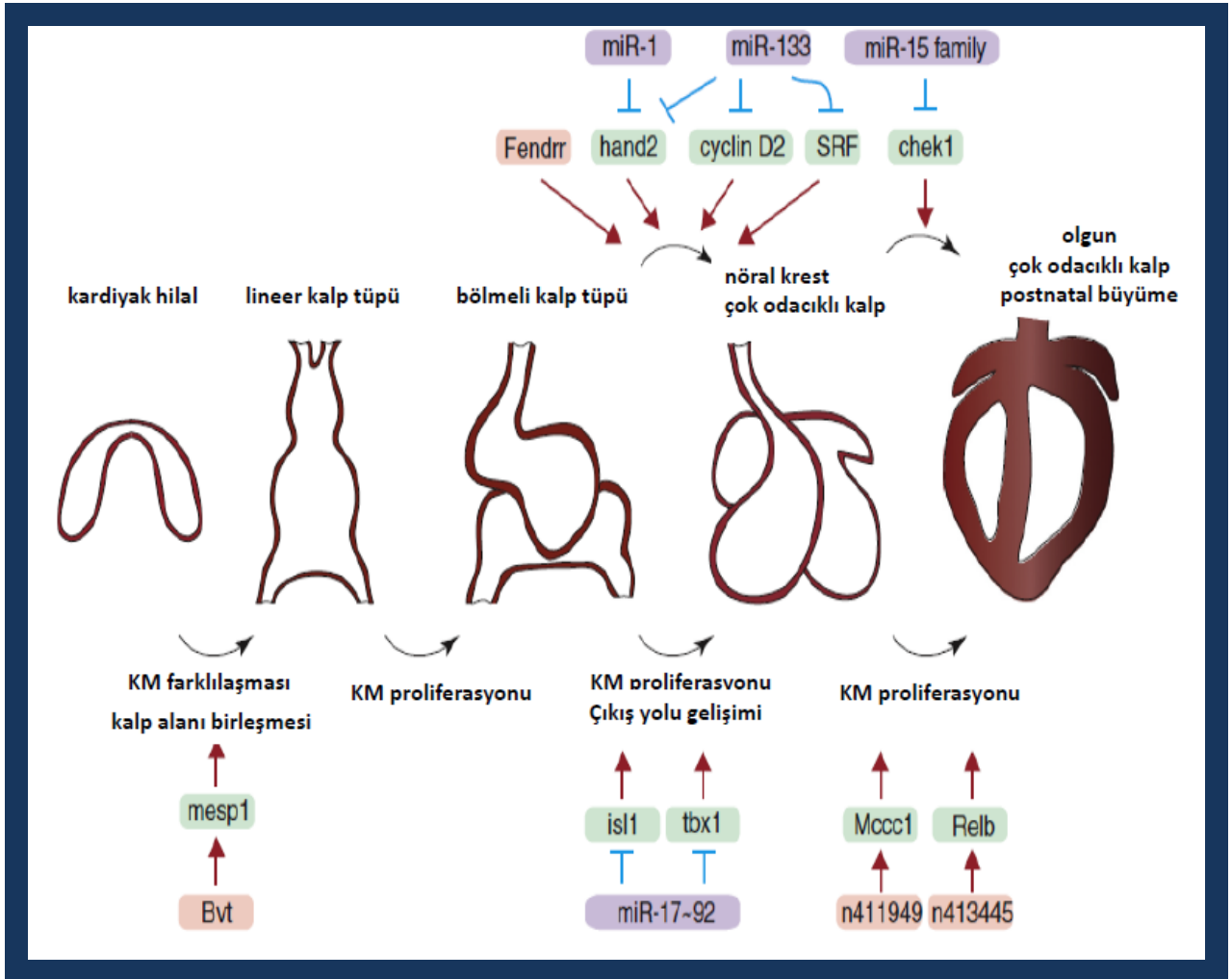
miR-17/92 grubu, ikinci kalp alanında bulunan kardiyak öncül hücrelerin miyokardiyal farklılaşması ile ilgilidir. Kemik morfogenetik proteinler olan Bmp2 ve Bmp4, miR-17/92 grubu aracılığıyla miyokardiyal farklılaşmayı gerçekleştirir. miR-17/92 grubu, kardiyak öncül genleri olan IsI1 ve Tbx1'in ekspresyonunu baskılamaktadır (136) (Şekil 11).

Fonksiyon kazanımı çalışmalarında miR-17/92 grubunun organ ebatının düzenlenmesinde yer aldığı vurgulanmaktadır. miR-17'nin aşırı ekspresyonu kalbi de içeren organ büyümesinde azalmaya neden olmaktadır. Buna karşılık miR-17/92 grubunun aşırı ekspresyonu, kardiyomiyositlerin hipertrofisini ve hiperplazisini teşvik etmektedir. Son zamanlarda transgenik miR-17/92 grubunun kardiyomiyositlerde aşırı ekspresyonunun embriyonik, postnatal ve yetişkin kalbinde kardiyomiyositlerin proliferasyonu için gerekli olduğu belirtilmektedir. miR-17/92 grubunun yetişkin kardiyomiyositlerinde aşırı ekspresyonunun, kalbi miyokard enfarktüsünün neden olduğu yaralanmaya karşı koruduğu ifade edilmektedir (137).

2.7.5.4 miR-15 ailesi

miR-15 ailesinin üyeleri postnatal dönemde kardiyomiyositlerdeki mitozun durdurulmasını düzenlemektedir. miR-15 ailesi miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-195 ve miR-497'den oluşmaktadır. Bu ailenin üyesi olan miR-195'in hedefi, hücre siklusunu kontrol eden kinaz 1 geni (Check1)dir. miR-15 ailesi, yenidoğanda kardiyomiyositlerdeki hücre siklusunun durdurulmasını yönetir (138). miR-15 ailesi yenidoğanda kalp rejenerasyonunu, postnatal kardiyomiyositlerin proliferasyonunu inhibe ederek gerçekleştirir (Şekil 11). Erken postnatal dönemden yetişkinlik dönemine kadar miR-15 ailesinin inhibisyonu, yetişkin kalbinde miyositlerin proliferasyonunu

artırdığı ve farede miyokard enfarktüsünden sonra sol ventrikülün sistolik fonksiyonunu geliştirdiği belirtilmektedir (139).



Şekil 11: Kalbin embriyonik gelişimi esnasında kodlamayan RNA'ların fonksiyonel rolü (140).

2.7.6 Kardiyak rejenerasyonda miRNA'lar

Yetişkin kalbinde, kardiyomiyosit üretimi aşırı derecede düşük olduğu için kardiyak rejenerasyon kapasitesi kısıtlıdır. Bundan dolayı kardiyak rejenerasyonun altında yatan hüresel ve moleküler mekanizmaları anlamak son derece önem taşımaktadır. Yetişkin kalbinde kardiyak rejenerasyona neden olan 3 strateji bulunmaktadır. Bu stratejiler; (1) hasarlanan miyokarda eksojen öncül kök hücrelerinin transplante edilmesi, (2) kalan öncül kök hücrelerinin olgun

kardiyomiyositlere farklılaşmasının teşvik edilmesi ve (3) varolan kardiyomiyositlerin proliferasyonunu artırmak şeklinde ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalarda 1. ve 2. stratejilerde hasarlanmış kalbin korunması için; yetişkin kök hücrelerinin, pluripotent kök hücrelerinin ya da hücrelerin yeniden programlanması kullanılmaktadır. 3. stratejinin uygulanabilmesi için kardiyomiyosit rejenerasyonunu içeren endojen sinyal yollarının artması son derece önemlidir (141).

İnsan kalbinde görülen rejenerasyon oranı fareden ya da sıçandan daha düşüktür. Yetişkin insan kalbinde kardiyomiyosit turnoveri yaşla birlikte giderek azalmaktadır (142).

Kodlamayan RNA'lar kalbin gelişiminde, hastalık ve tamir sürecinde yer alan özelleşmiş biyolojik süreçlerden sorumludur. Bu süreçler; transkripsiyonel düzenlenmeyi, post-transkripsiyonel gen kontrolünü, epigenetik kontrolü ve nükleer genomun organizasyonunu içermektedir (142-144).

Kodlamayan RNA'ların düzenleyici etkilerini; kardiyomiyositlerin proliferasyonu, kardiyomiyositlerin farklılaşması, kardiyomiyositlerin canlılığını sürdürmesi ve kardiyomiyositlerin yeniden programlanması olarak kategorize edebiliriz (141).

2.7.7 Kardiyomiyositlerin proliferasyonu

İnsan neonatal kardiyomiyositlerinin proliferasyonunu artıran miRNA'lar yeni yöntemler kullanılarak görüntülenmiş ve 204 adet miRNA'nın kontrol grubuyla karşılaştırıldığında proliferasyonu 2 katın üzerinde artırdığı tanımlanmıştır. Bu miRNA'lardan miR-590 ve miR-199a'nın hem in vitro hem de in vivo'da kardiyomiyosit proliferasyonunu teşvik ettiği ve hücre siklusunu aktive ettiği gösterilmiştir. Yanısıra miR-1825, miR-518 ve miR-302b'nin kalbe özgü etkilerinin olduğu da görülmüştür (141).

Kalpte miR-17-92 ailesinin transgenik aşırı ekspresyonu; embriyonik, postnatal ve erişkin kalbinde fosfataz ve tensin (PTEN)'i inhibe ederek kardiyomiyositlerin proliferasyonuna neden olduğu belirtilmektedir (145).

miR-302-367, gelişimsel ve yetişkin dönemde kardiyomiyosit proliferasyonunu teşvik ettiği ifade edilmektedir (146). miR-302-367'nin geçici aşırı ekspresyonu, Hippo sinyal yolağı

aracılığıyla kardiyomiyositlerin proliferasyonunu arttırırken, kardiyak fibrozisi azalttığı ve yaralanmadan sonra kardiyak fonksiyonun gelişmesine neden olduğu bildirilmektedir.

Kalpte miR-222'nin aşırı ekspresyonu kardiyak yeniden yapılanmaya direnç gösterilmesine ve iskemi/reperfüzyon yaralanmasından sonra fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır. miR-222'nin inhisyonunun ise egzersize cevap olarak oluşan kardiyak büyümeyi bloklamaktadır.

Kardiyomiyositlerin proliferasyonuna neden olan miRNA'lar olduğu gibi kardiyak rejenerasyonu baskılayan miRNA'lar da bulunmaktadır. 1 ile 10 günlük fare kalbinde yapılan bir çalışmada, miR-15 ailesinin hücre siklusunda bulunan çeşitli genlerin baskılanmasına ve postnatal hücre siklusunun durmasına aracılık ettiği gösterilmiştir (147). miR-15 ailesi postnatal kardiyomiyosit proliferasyonunu baskılayarak neonatal kalp rejenerasyonunu modüle etmektedir. Bunun da postnatal kardiyak rejeneratif kapasitenin kaybına yol açtığı belirtilmektedir (148). Erken postnatal dönemden erişkin döneme kadar olan sürede miR-15 ailesinin inhibisyonu; kardiyomiyositlerin proliferasyonunu arttırırken, miyokard enfarktüsünden sonra sol ventrikülün fonksiyonunda düzelmeye neden olduğundan bahsedilmektedir (148,149).

miR-1 ve miR-133 hem kalp kasında hem de iskelet kasında eksprese olur ve transkripsiyon faktörleri olan serum response factor (SRF), miyosit enhancer factor-2 (Mef2) ve myogenic differentiation (MYOD) tarafından düzenlenir (150). Farede gelişme esnasında miR-1'in aşırı ekspresyonu; kalp transkripsiyon faktörü ve nöral krestten köken alan protein 2 (Hand 2)'yi baskılayarak kardiyomiyosit proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (150-152). miR-133a'nın aşırı ekspresyonunun kardiyomiyosit proliferasyonunda azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (153) (Şekil 11).

2.7.8 Kardiyomiyositlerin Farklılaşması

miRNA'lar; kardiyak öncüllerin kardiyomiyositlere farklılaşmasında ve bu durumun devam ettirilmesinde önemli rol oynamaktadır (154).

miR-1; kardiyomiyosit proliferasyonunda azalmayı Hand2'yi baskılayarak gerçekleştirir. Fonksiyon kaybı ve kazanımı üzerine yapılan çalışmalarda miR-1'in hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve farklılaşmayı teşvik ettiği gösterilmiştir (155-157).

miR-133'ün yokluğunda ise miyositlerin SRF ve G1/S-spesifik cyclin-D2 (CyclinD2) 'nin aktivasyonu ile çoğaldığı belirtilmektedir. miR-133, kardiyak proliferasyon ve farklılaşmayı inhibe etmektedir (158).

miR-499'un aşırı ekspresyonu kardiyak öncül hücrelerinin proliferasyonunu azaltırken, fare embriyonik kök hücrelerinde kalbe özgü transkripsiyon faktörleri olan GATA4 ve Mlc-2v'yi upregüle ederek kalp atışını düzenleyen embriyonik cismin oluşumunu teşvik etmektedir (156). İn vivo ve in vitro çalışmalar miR-499'un kardiyak farklılaşmayı teşvik ettiğini göstermektedir.

Kodlamayan RNA olan H19'un down regüle olması embriyonik kök hücrelerinin kardiyomiyositlere farklılaşmasını teşvik etmektedir (159).

2.7.9 Kardiyomiyositlerin Canlılığını Sürdürmesi

Kardiyomiyositlerde iki farklı hücre ölümü şekli olan apoptozis ve nekroza, kalp hastalıklarının ilerlediği aşamada rastlanmaktadır (160).

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü ekstrinsik ve intrinsik olarak bilinen iki farklı yolağın aktivasyonu sonucunda oluşur. Ekstrinsik yolda ekstrasellüler ölüm molekülleri aktive olur. Bu ölüm molekülleri TNF-alfa ya da FAS-ligandı olup, hücre ölümüne yol açan intrasellüler sinyal yollarını aktive eder (161).

Intrinsik apoptotik yolağın mitokondri aracılığıyla gerçekleşmekte olup (162), pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerden oluşan BCL-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir (163). Pro-apoptotik üye olan Bax normalde stoplazmada bulunur. Bax, hücre stresini takiben BCL-2 ile heterodimer oluşturarak hücre ölümünü teşvik etmek için mitokondriye taşınır. Bax'ın translokasyonu mitokondriden sitokrom C'nin salınımına neden olarak kaspaz-3, kaspaz-9 ve bir seri downstream apoptotik olayların aktivasyonuna yol açar (164).

Sıçanlarda adenovirüs aracılığıyla miR-21'in aşırı ekspresyonu kardiyak fibrozisi 24 saatte % 29 oranında azaltmaktadır. Ayrıca 2 haftada ventrikül çapını azalttığı ve miyokard enfarktüsünden sonra enfarktüslü bölgede apoptozu azalttığı gösterilmiştir (165,166). Bu çalışmalar miR-21'in kardiyak canlı kalmayı ve apoptozu teşvik ettiğini göstermektedir.

miR-24, miR-21 ile benzer fonksiyonlara sahip olup; kardiyak apoptozu azaltırken, BH3-domain-içeren-protein (Bim)'i baskılayarak hücre sayısını %53 oranında artırmaktadır. Fare miyokard enfarktüsü modelinde, miR-24'ün aşırı ekspresyonu kardiyak apoptozise karşı

koruyucudur (167). Bir miyokard enfarktüsü modelinde, kardiyak öncülü hürelere miRNA kokteyli (miR-21, miR-24 ve miR-221) aktarılmış ve bu hürelere miyokarda enjekte edildiğinde Bim'in kontrolünde kalp yetmezliğini azalttığı görülmüştür (168). miRNA kokteylinin kardiyak progenitör hürelere aktarılmasının kalp hücrelerinin canlı kalmasını artırarak kardiyak fonksiyonu geliştirmektedir.

miR-199a hipoksik koşullarda hipoksi-inducible factor (Hif)-1'in upregülasyonu aracılığıyla kardiyomiyositlerde down regülasyona neden olmaktadır. miR-199a hipoksiyle ilgili yolağın düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır ve hipoksik hasarın olduğu yerde apoptozisi azalttığı belirtilmektedir (169,170).

miR-34a kalbin yaşlanmasına neden olmaktadır. In vivo miR-34a'nın aşırı ekspresyonu yaşa bağlı durumda kalp yetmezliğine neden olur. Miyokard enfarktüslü farelerde miR-34a'nın inhibisyonu kardiyak fibrozisi azaltırken, kardiyak fonksiyonun gelişmesine neden olur. miR-34a bu görevini serine/threonine-protein phosphatase 1 regulatory subunit 10 (PNUTS)'u aktive ederek gerçekleştirir (171).

miR-320 ile yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda kalpte iskemi/reperfüzyon yaralanmalarında miR-320 önemli oranda artmıştır. Kalpte in vivo ve ex vivo iskemi/reperfüzyon yaralanmalarından oluşan çalışmalarda, miR-320'nin fonksiyon kazanmasının enfarktüs ölçüsünde ve apoptozda artışla sonuçlanmaktadır (172).

miR-29'un down regüle olması kalbi iskemi/reperfüzyon yaralanmasına karşı korumaktadır. Bu koruyucu etkiyi proapoptotik molekül olan Bax'ın ekspresyonunu azaltmayla ve anti-apoptotik molekül olan Bcl2'nin ekspresyonunu artırarak gerçekleştirmektedir (173).

Aşırı strese maruz kalındığında örneğin oksijen ve besin eksikliğinde kardiyomiyositler nekroza gitmektedir. Nekroz, apoptoz ve otofajiden farklı karakteristik özellikler göstermektedir. Hücre hacminde artma, organellerin şişmesi, membran içeriğinin parçalanması ve ATP kaybı gibi kompleks morfolojik değişiklikler gözlenmektedir (174). Nekrozu takiben kardiyomiyositlerin hücre içi içeriklerinin ekstrasellüler ortama salınması ciddi patolojik sonuçlara neden olan inflamatuvar reaksiyonların tetiklenmesine yol açmaktadır (175).

Önceden nekrozun dışardan gelen güçlü zararlı etkilere bağlı olarak pasif bir şekilde gerçekleştiği düşünülüyordu. Oysa şimdilerde nekrozun apoptoza benzediği ve çeşitli yollar tarafından kontrol edildiği kabul edilmektedir. Programlı hücre ölümü olarak kabul edilen nekrozun (176), nekroptozis olarak adlandırılması gerektiği belirtilmektedir. Bu düzenli hücre

ölüm yolağının çoğunlukla TNF-alfa aracılığıyla receptor interacting protein 1 ve 3 (RIP1 ve RIP3) kinazların aktivasyonu ile gerçekleştiği ifade edilmektedir (177).

Nekroz, mitokondriyal içeriğin parçalanmasıyla da oluşabilmektedir (178). Bu şekilde oluşan nekroza bağlı olarak ATP'de azalma, reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretimi, organelde hasar ve şişme gibi değişiklikler gözlenir (179).

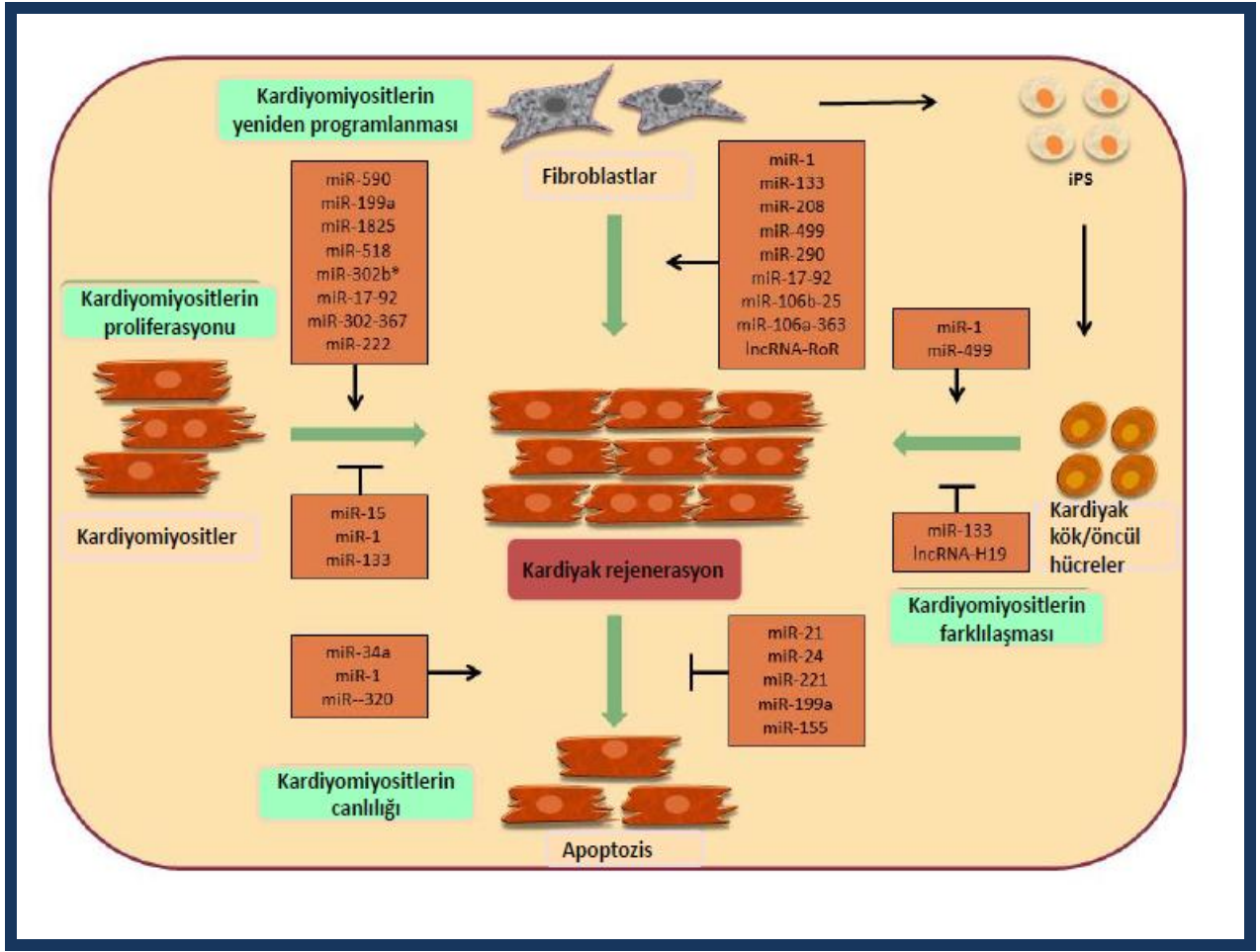
2.7.10 Kardiyomiyositlerin Yeniden Programlanması

Son zamanlarda in vitro yapılan bir çalışmada, miR-1, miR-133, miR-208 ve miR-499'dan oluşan kombinasyonun janus kinase (JAK) inhibitörü uygulandıktan sonra fibroblastların kardiyomiyosit benzeri hücrelere yeniden programlandığı doğrulanmıştır (180). Kardiyak yeniden programlanmanın artması kardiyak fibrozisin azalmasına ve kalp fonksiyonunun gelişmesine neden olmaktadır (181).

Bunların yanısıra birtakım çalışmalarda bilindiği üzere miR-302 ailesi, miR-290 ile benzer dizilere sahip olup fibroblastların olgun kardiyomiyositlere programlanmasını artırmaktadır (182-184).

Ayrıca diğer bir çalışmada miR-17-92, miR-106b-25 ve miR-106a-363 grubunun fibroblasttan kardiyomiyosite yeniden programlanma sürecinde yüksek oranda eksprese oldukları rapor edilmiştir. miR-106b-25 grubunda bulunan miR-93 ve miR-106b'nin upregülasyonu yeniden programlanma faktörlerinden 3'ünün (Oct3/4, Sox2 ve Klf4) ya da bunlara ilave (c-Myc)'nin artmasına neden olmaktadır (185).

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA-ROR), fibroblastların indüklenmiş pluripotent kök hücrelerine (İPS) ya da kardiyomiyositlere yeniden programlanmasını regüle etmektedirler (186).



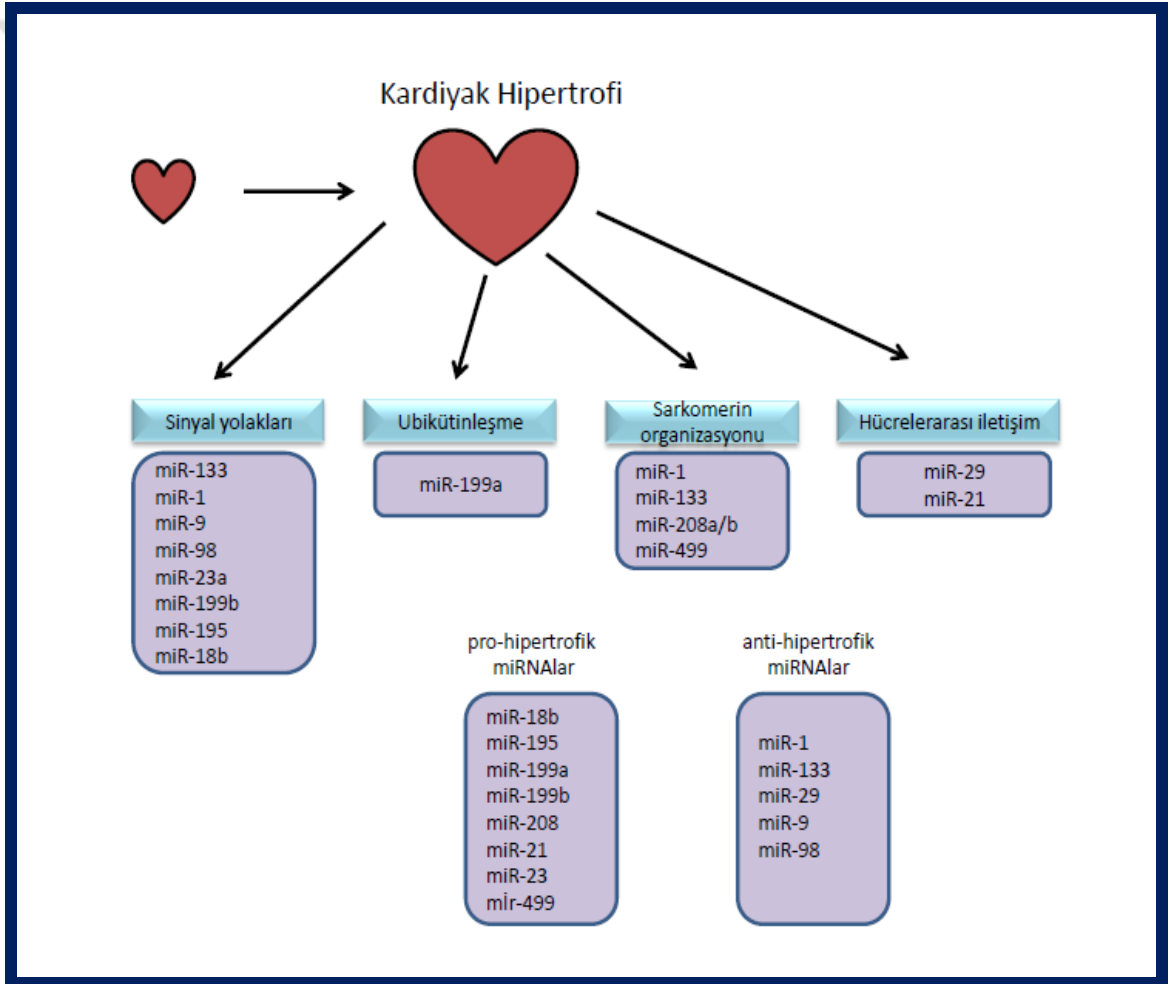
Şekil 12: Kardiyak rejenerasyonda yer alan kodlamayan RNA'lar (141)

→ : Aktivasyonu göstermektedir.

—| : İnhibisyonu göstermektedir.

2.8 KARDİYAK HİPERTROFİDE miRNA'LARIN ROLÜ

miRNA'lar; kardiyak hipertrofiye özgü olan sinyal yollarını (miR-133, miR-1, miR-9, miR-98, miR-199b, miR-23a) ve ubiquitinleşme süreçlerini (miR-199a) etkileyerek, sarkomerin kompozisyonunda (miR-1, miR-133, miR-208a/b ve miR-499) ve intersellüler haberleşmede (miR-29 ve miR-21) değişikliğe bağlı olarak kardiyak hipertrofinin gelişmesini düzenlemektedir (115) (şekil 13).



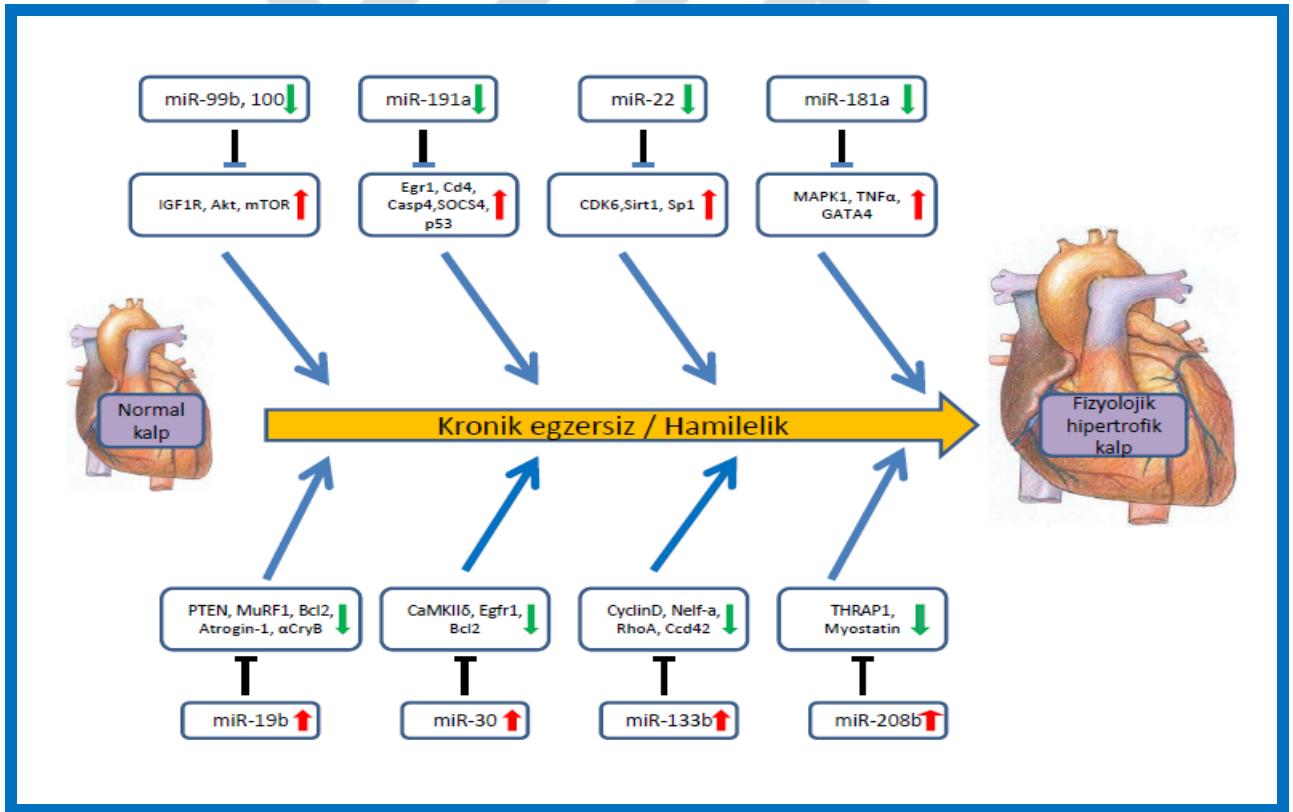
Şekil 13: KH'nin gelişiminden sorumlu olan miRNA'ların yer aldığı süreçlerin şematik gösterimi (115)

2.9 FİZYOLOJİK KARDİYAK HİPERTROFİDE miRNA'LARIN ROLÜ

Fizyolojik kardiyak hipertrofiye neden olan yollar; insulin like-growth faktör (IGF-1), PI3/Akt /mTOR, MAPK ve p53 sinyal yolağı olarak belirtilmektedir (şekil 14). Kemi ve ark. kardiyak Akt /mTOR sinyal yolağının aktivasyonunun ya da inaktivasyonunun fizyolojik ve patolojik hipertrofide farklılık gösterdiğinden bahsetmektedir (187).

Şekilde yer alan miRNA'ların apoptozu ve hücre ölümünü düzenleyebileceği vurgulanmaktadır. Ayrıca bu miRNA'ların patolojik ya da fizyolojik hipertrofiyi de belirleyebilecekleri ifade edilmektedir (şekil 14).

Fizyolojik kardiyak hipertrofide yer alan miRNA'lar; miR-19b, miR-30, miR-133b, miR-208b, miR-99b, miR-100, miR-191a, miR-22 ve miR-181a olarak ifade edilmektedir. Bu miRNA'lardan upregüle olanlar; miR-19b, miR-30, miR-133b ve miR-208b'dir. Down regüle olanlar ise; miR-99b, miR-100, miR-191a, miR-22 ve miR-181a'dır (188).



Şekil 14: Fizyolojik kardiyak hipertrofinin miRNA'lar tarafından düzenlenmesi . Kardiyak hipertrofinin gelişiminde yer alan miRNA'ların ve hedef genlerinin şematik gösterimi (188)

→ : Aktivasyonu göstermektedir.

—| : İnhibisyonu göstermektedir.

Farklı çalışmalarda sıçanlara uygulanan yüzme egzersiziyle oluşturulan fizyolojik kardiyak hipertrofi sırasında eksprese olan miRNA'lar, hedef genleri ve kardiyovasküler sistemdeki fonksiyonları karşılaştırmalı olarak Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Kalpte kardiyak hipertrofi esnasında önemli oranda upregüle ve downregüle olan miRNA'lar ve hedef genleri gösterilmektedir (188).

miRNA	Hedef geni	Çalışma sonucu	Kardiyak sistemdeki rolü (Önce yapılan çalışmaların sonucunu göstermektedir)
miR- 19b	PTEN, MuRF, Bcl2, Atrogin-1, α CryB	Fizyolojik hipertrofide önemli oranda upregüle olmaktadır.	Kardiyak hipertrofiyi pozitif olarak düzenlemektedir. Hücre canlılığını artırırken, apoptozu negatif olarak düzenlemektedir (189).
miR- 30	CaMKII δ , Egfr1, Bcl2	Fizyolojik hipertrofide önemli oranda upregüle olmaktadır.	Patolojik hipertrofide mir-30 ailesi down regüle olmaktadır (190).
miR-133b	CyclinD, Nelf-A, RhoA, Ccd42	Fizyolojik hipertrofide önemli oranda upregüle olmaktadır.	Patolojik hipertrofide mir-133 upregüle olmaktadır (191).
miR-208b	THRAP1, Myostatin	Fizyolojik hipertrofide önemli oranda upregüle olmaktadır.	Kalp yetmezliği sırasında miR-208a'nın inhibisyonu kalp fonksiyonunun gelişmesini ve canlı kalmayı sağlamaktadır (192).
miR-99b	IGF1R, Akt, mTOR	Fizyolojik hipertrofide önemli oranda downregüle olmaktadır.	mir-99a/let-7c grubu epigenetik faktörleri değiştirerek kardiyomiyogenezi kontrol etmektedir (193).
miR-100	IGF1R, Akt, mTOR	Fizyolojik hipertrofide önemli oranda downregüle olmaktadır.	miR-100 kalp yetmezliği sırasında upregüle olmaktadır (194).
miR-191a	Egr1, Cd4, Casp4, SOCS4, p53	Fizyolojik hipertrofide önemli oranda downregüle olmaktadır.	miR-191a'nın kardiyak sistemdeki rolü belirtilmemiştir. Alzheimer hastalığında, diyabette ve farklı kanser türlerinde farklı eksprese olmaktadır (188).
miR-22	CDK6, Sir1, Sp1	Fizyolojik hipertrofide önemli oranda downregüle olmaktadır.	miR-22, stresin neden olduğu kardiyak hipertrofide ve remodelingde önemli rol oynamaktadır (195).
miR-181a	MAPK1, TNF α , GATA4	Fizyolojik hipertrofide önemli oranda downregüle olmaktadır.	miR-181a, kardiyovasküler sistemde inflamasyona cevapta önemli rol oynamaktadır (196).

2.10 DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KARDİYAK HİPERTROFİ MODELLERİNDE KULLANILAN EGZERSİZ ÇEŞİTLERİ

Egzersizin neden olduğu kardiyak hipertrofiyle ilgili moleküler mekanizmaları anlamak için deney hayvanlarında yapılan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Deney hayvanı olarak sıçan ve fare kullanılmakta olup; bu hayvanlara koşu bandı, tekerlek çevirme ve yüzme egzersiz modelleri uygulanabilmektedir. Yüzme egzersizinin, koşu bandı ya da tekerlek çevirmenin fizyolojik hipertrofi oluşturma açısından eşit derecede etkili olduğu vurgulanmaktadır.

Yüzme egzersizi; hayvanların belirlenen sürede su tankında yer değiştirmesiyle başlar. Uygulanan egzersiz programının süresi ve şiddetine bağlı olarak meydana gelecek cevabın büyüklüğünde farklılıklar görülür. Yüzme egzersizinin süresi farklılıklar göstermekte olup, günde 1 saatten oluşan 1 haftalık yüzme egzersizinden sonra dahi adaptasyonel değişikliklerin görüldüğü ifade edilmektedir (197). 4 veya 6 haftalık, günde 60 ya da 90 dk süreyle, haftada 1 ya da 2 kez yapılan yüzme egzersizinin ortaya çıkan cevabın büyüklüğünü etkilemeyeceği belirtilmektedir. Vücut ağırlığının %2 ya da %4'ü kadar dışardan uygulanan ağırlıkların daha fazla hücre hipertrofisine neden olarak cevabı etkileyebilmektedir (198).

Suyun sıcaklığı fizyolojik hipertrofiyi linear olmayan bir şekilde etkilemektedir. Genç sıçanlarda 25 °C'de yapılan yüzme egzersizinin, 35 °C'de yapılan yüzme egzersizine göre daha fazla kardiyak hipertrofiye neden olduğu belirtilmektedir. Suyun sıcaklığının 30-36 °C arasında olması benzer hipertrofik cevap oluştururken, 38 °C olması hipertrofinin oluşmasını olumsuz yönde etkilemektedir (199). Su tankının derinliği, hayvanların sayısı ve suyun hareketi de oluşan cevabı etkileyen diğer faktörler olarak gösterilmektedir (200).

2.11 Çalışmada Kullanılan Moleküler Yöntemler

2.11.1 Mikroarray Yöntemi

Mikroarray yöntemi binlerce genin ekspresyonunu tanımlamada kullanılmaktadır. Bu yöntemde, belli sayıda noktaların olduğu inert bir yüzey bulunmaktadır. Her nokta tek bir türe ait nükleik asite ilgisi olan problardan oluşmaktadır. İşaretli biyolojik materyal ve prob arasındaki hibridizasyon sonucu sinyal açığa çıkar. Elde edilen sinyalin seviyesine bakılarak biyolojik

örnekteki genin ekspresyonu hakkında bilgi edinilir. Mikroarray yönteminin avantajı, büyük miktarda DNA dizisine ihtiyaç duymaması ve aynı anda binlerce genin görülebilmesini sağlamasıdır (201,202).

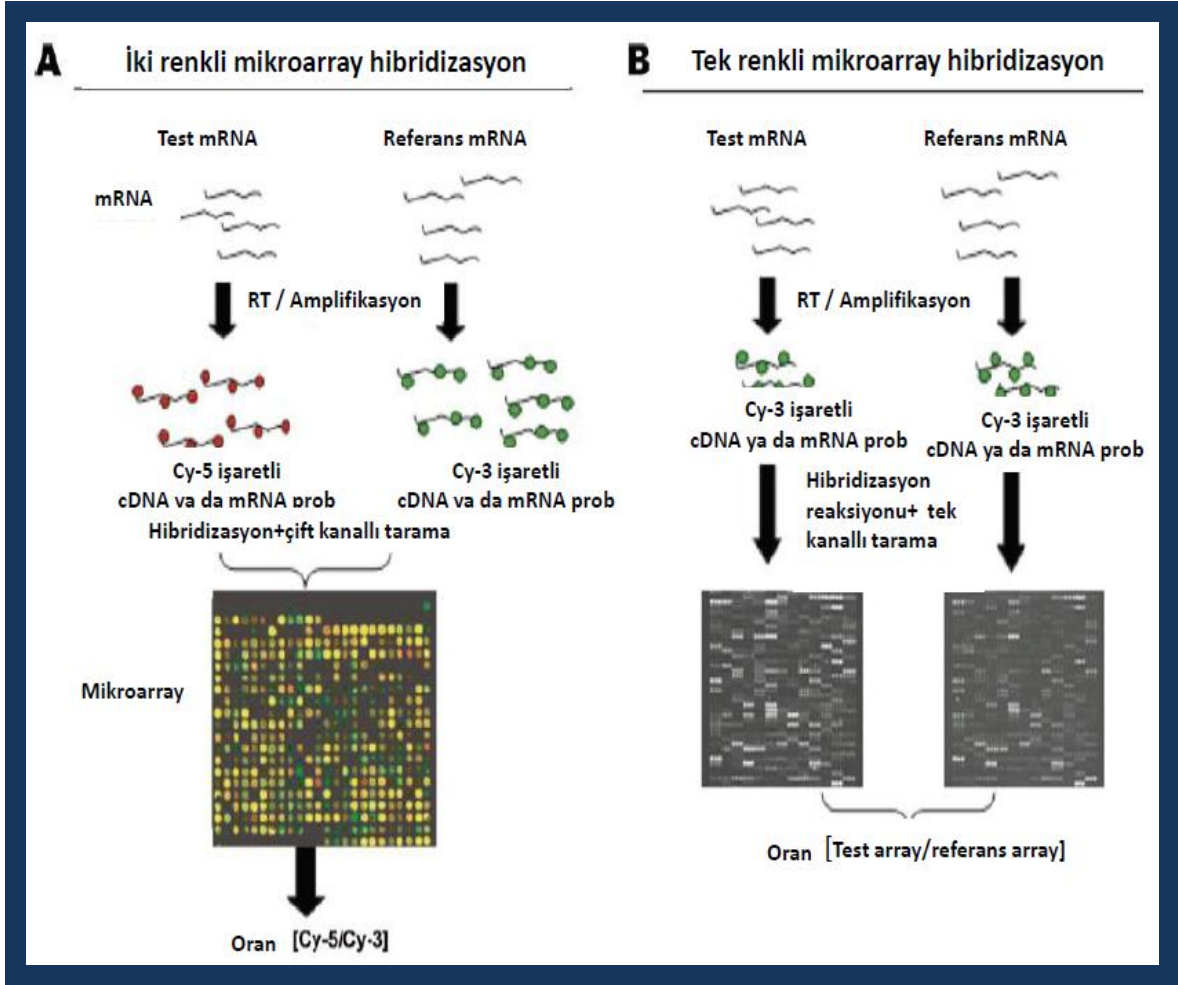
Mikroarray yöntemi; DNA, protein, doku, hücrel ve kimyasal içerikli mikroarray olmak üzere çeşitli alt gruplara ayrılır. DNA mikroarraylerinden en yaygın olarak kullanılan mikroarrayler, afimetriks oligonükleotid çipleri ve spot cDNA arrayleridir (203,204). Bizim çalışmamızda afimetriks oligonükleotid çipleri kullanılmıştır.

2.11.1 Afimetriks Gen Çip Yöntemi

Mikroarrayler 25 nükleotid uzunluğundaki problemleri kullanmaktadır. Her gen dizisi 12-20 farklı prob çiftiyle temsil edilir. Her prob çifti, tam eşleşen ve yanlış eşleşen oligonükleotitlerden oluşur. Tam eşleşen prob ilgili gen dizisine komplementerken, yanlış eşleşen probda bazların merkezinde bulunan bir baz yanlış eşleşir (13. baz). Yanlış eşleşen prob, floresan ölçümleri kullanarak her non-spesifik hibridizasyon sinyalini ya da kontaminasyonu tahmin etmektedir (205,206).

Biyolojik materyalden total RNA ya da mRNA izole edilir. Total RNA, reverse transkripsiyon PCR yöntemi kullanılarak çift zincirli cDNA'ya dönüştürülür. İn vitro transkripsiyonla cDNA'dan biotinle işaretli cRNA üretilir. Biotinle işaretli cRNA daha küçük segmentlere ayrılır ve arrayde hibridize olur. Bir seri yıkamayla hibridize olmayan materyal uzaklaştırılır. Array, biotinli cRNA'ya bağlı uygun floresan boyayla inkübe edilir. Array bir tarayıcıya yerleştirilerek floresan boyamanın ışınması ölçülür (207). Işımanın şiddetine bakılarak ilgili gende bulunan mRNA seviyesi tahmin edilmeye çalışılır.

Oligonükleotid arrayler, spesifik bir dalga boyuna sahip bir ya da iki floresan boya kullanarak sinyallerin birbirinden net bir şekilde ayırt edilmesini sağlar (Şekil 15). Tek boya metodunda, referans ve test arrayleri arasında karşılaştırmaya izin verir. İki boyalı metodda, aynı arrayde iki örneğin ekspresyon profilleri karşılaştırılır. En sık kullanılan floresan boyalar siyanin-3 (yeşil) ve siyanin-5 (kırmızı)tir. Hibridizasyonun derecesi kırmızı ve yeşil spektrum arasında görülmektedir. Hibridizasyondan sonra slidelar konfokal tarayıcıyla taranarak her boya için floresan şiddetinin ölçümü ve her noktanın aydınlığı hakkında bilgi verir. Sinyal şiddetlerinin ölçümüyle, kontrol/referansa göre test örneklerinde bulunan mRNA türlerinin miktarı rölatif olarak tanımlanır.



Şekil 15: Mikroarray yönteminin şematik gösterimi (208).

2.11.2 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (REAL-TIME PCR)

Real-Time PCR yöntemiyle; genotipleme, SNP (tek nükleotit değişikliği) analizi, portatif gen çalışmaları (gen-knockdown çalışmaları) gibi kalitatif ve kantitatif analizler yapılmaktadır.

Real-time PCR sisteminin temelini, flouresan ışımaların tespiti ve miktarın belirlenmesi oluşturmaktadır (209). Sinyal artışı, PCR ürün artışıyla orantılı olarak gerçekleşir. Her bir PCR döngüsünde gerçekleşen flouresan ışımaya kaydedilerek, başlangıçtan itibaren ürün artışına hangi noktada ulaşıldığı eş zamanlı olarak izlenir.

DNA amplifikasyonu flouresan sistemlerden biri olan SYBR Green yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde SYBR Green I gibi çift zincirli DNA'ya bağlanabilen (non-spesifik amplifikasyon ve primer dimerizasyonu dahil), diziyeye spesifik olmayan bir boya

kullanılır. SYBR Green solüsyon halinde çok az ışımaya yaparken, çift zincirli DNA'ya bağlanınca güçlü ışımaya neden olur. Floresan işaretli proba ihtiyaç duyulmaması yönteme avantaj sağlamaktadır. Eşikdeğer döngüsü (threshold cycle = CT); üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. CT değeri; sistemin çalışmaya başlamasından itibaren ürün oluşmasını ve logaritmik lineer faza geçiş noktasını göstermektedir. Logaritmik faza yakınlık, reaksiyonun gücünü gösterir.

Diğer kantitatif PCR yöntemlerinin aksine Real-Time PCR'da, PCR ürünlerinin kontaminasyonunu önlemeye ve örneklerin elektroforeze tabi tutulmasına gerek duyulmaz (210,211).



2. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 ÇALIŞMADA YER ALAN HAYVANLAR ve DENEY GRUPLARI

Çalışmaya, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 02.10.2014 tarihli Etik Kurul Onay Raporu doğrultusunda başlandı.

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Araştırma Merkezi bünyesindeki Hayvan Deneyleri Bölümünden, ağırlıkları 300-350 gr arasında olan 15 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan temin edildi. Egzersiz protokolünün uygulanması ve sıçanların bakımı aynı merkezde gerçekleştirildi. Bu merkezde; 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık uygulamasına, ortamın iyi havalandırılmasına, sıçanların standart kafeslerde barındırılmasına, besin ve su kısıtlaması olmamasına dikkat edildi. Çalışma; egzersiz grubu (n=9) ve kafes içindeki aktivite ile sınırlı olan kontrol grubu (n=6) olarak ikiye ayrıldı. Gruplardaki sıçanların sayısı; yapılan power analizine göre belirlendi.

Aerobik egzersizle kardiyak hipertrofi oluşturmak için yüzme egzersiz modeli kullanıldı. Yüzme egzersizi; 35 cm derinliğinde ve 50 cm çapında, pleksiglastan yapılmış silindirik 2 adet su tankı kullanılarak gerçekleştirildi. Tanklara konulan suyun sıcaklığı 30-32 °C arasında olacak şekilde ayarlandı.

3.2 EGZERSİZ PROTOKOLÜ

Sıçanlar egzersiz programına başlamadan önce alıştırma egzersizine tabi tutuldu. Bu süreç 7 gün olup; 1. ve 2. gün 20 dk, 3. gün 30 dk, 4. ve 5. gün 40 dk, 6. ve 7. gün 50 dk'lık sürelerle yüzme egzersizi uygulandı. Daha sonra 10 hafta kardiyak hipertrofi oluşturacak aerobik egzersiz protokolü uygulandı. Bu protokolün 8 haftalık bölümünde sıçanlara 60 dk süreyle, günde 1 kez, haftanın 5 günü yüzme egzersizi uygulandı. 9. haftada günlük egzersiz 2'ye çıkarıldı, 10. haftada günlük egzersiz 3'e çıkarılarak protokol tamamlandı (212).

Kalbin boyut ve fonksiyonlarının değerlendirilmesi için egzersiz programı öncesinde ve sonrasında her iki grubumuzda bulunan tüm sıçanlara intraperitoneal olarak Ketamin (45 mg/kg) ve Ksilazin (5 mg/kg) anestezisi altında ekokardiyografi yöntemi uygulandı.

3.3 EKOKARDİYOĞRAFI

Ekokardiyografik ölçümler Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan S12-4 transdüseri olan Philips HD7 XE ultrason sistemi (Philips Medical Systems, Andover, Massachusetts) kullanılarak gerçekleştirildi. M-mode ve Doppler (100 ya da 150 mm/s hızla taranarak) ölçümler yapıldı. Ölçümler Amerikan Ekokardiyografi Derneği tarafından kabul edilen ilkelere göre gerçekleştirildi (213). Hayvanların göğüs kafesi traşlandı ve hayvanlar sol lateral dekübitus pozisyonunda tutuldu. Sol ventrikülün papiller kas seviyesinde iki boyutlu görüntüsü kaydedildi (214). M-mode aracılığıyla sol ventrikülün internal çapı (sistolik ve diyastolik), interventriküler septum ve posterior duvar kalınlığı (diyastol sonu) ölçüldü. Bütün gözlemler aynı gözlemci tarafından, aynı oda ve günde öğleden sonra yapıldı.

Ölçülen parametreler: Diyastolik interventriküler septum kalınlığı (IVS), diyastolik sol ventrikül çapı (LVDd), posterior duvar kalınlığı (LVPWT), sistolik sol ventrikül çapı (LVDs), sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (LVEF) ve sol ventrikül fraksiyonel kısalma (LVFS)'den oluşmaktadır. Sol ventrikülün kütlesi; $LV\ mass = 1,04 \times \left[(LVDd + LVPW + IVS)^3 - LVDd^3 \right]$ gr formülüne göre hesaplandı.

3.4 ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Egzersiz programı sonrasında sıçanların anestezisi altında önce kalpten kan örneği alındı daha sonra moleküler ve histolojik analizler yapılmak üzere kalp dokusu alındı.

RNA kolay degrade olduğu için kalbin sol ventrikülü çıkarılır çıkarılmaz küçük parçalara ayrılarak sıvı azotta donduruldu. Kan örnekleri jelli biyokimya tüplerine alındıktan yaklaşık 10 dk sonra, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri DNase-RNase-free ependorf tüplere konularak üçe ayrıldı. Doku ve serum örnekleri -80 °C'lik derin dondurucuda çalışma gününe kadar saklandı. Alınan serum örneklerinden dolaşımda bulunan miRNA'ların analizi yapıldı.

3.5 MOLEKÜLER ANALİZLER

RNA İzolasyonu

Dokuların homojenizasyonu seramik boncuklu DNase-RNase-free (Lysing Matrix D 2 ml- MP BİO) tüpler kullanılarak yapıldı. Buz üzerine konulan bu tüplere alınarak içerisine 400 µl lysis buffer solüsyonu konuldu. Kalp dokusundan 50 mg tartılarak lysis buffer solüsyonuna konuldu ve FastPrep®-24 örnek hazırlama sistemi (M.P. Biomedicals Irvine, California, USA) kullanılarak dokular homojenize edildi. Elde edilen homojenattan total RNA izolasyon kiti (GenUP™ TotalRNAKit-Biotechrabbit) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı.

Dolaşımda bulunan miRNA'ların analizi için de total RNA izolasyonu; her bir serum örneğinden 400 µl alınarak, aynı kit ve protokol takip edilerek yapıldı. Hem doku hem de serum örneklerinden elde edilen total RNA'ların miktar ve saflığı ölçüldü.

RNA'nın miktar ve saflığının ölçümünde spektrofotometrik yöntem kullanıldı. RNA örneklerinin saf suya karşı 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri okundu. RNA ölçümünde 260 nm'de okunan 1 optik dansite 40 µg/ml konsantrasyonunu ifade etmektedir.

Örneklerin RNA konsantrasyonunu hesaplamak için; $C (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorbans değeri} (OD_{260}) \times 40$ formülünden faydalanıldı.

Daha sonra OD_{260}/OD_{280} oranı hesaplanarak RNA'nın saflık derecesi belirlendi.

Egzersiz ve kontrol gruplarında bulunan sıçanların kalp dokularından elde edilen RNA'lar her bir grup için bir tüpte 50 ng/µl olacak şekilde eşit miktarda karıştırılarak havuz oluşturuldu. Oluşturulan havuzdan tüm genomun miRNA açısından taranması mikroarray yöntemiyle yapıldı. Çalışmanın bu aşaması hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi (Ay-ka Ltd. Şti).

miRNA'ların kantitasyon analizinin yapılabilmesi için öncelikle total RNA'nın yapısında bulunan miRNA'lardan cDNA sentezi kit (qScript™ microRNA Synthesis Kit-VWR) kullanılarak yapıldı.

cDNASentezi

miRNA'ların yapısında polyAdenin (polyA) grupları bulunmaz. Örneklerden izole edilen miRNA'lara birinci aşamada polyA kuyruğu eklendi. Çalışmanın protokolü;

<u>Komponentler</u>	<u>Hacim</u>
Poly (A) Tailing Buffer (5x)	2 µl
Poly (A) Polimeraz	1 µl
Nükleaz-free su	4 µl
MikroRNA örneği	3 µl
Son hacim	10 µl

PCR yapıldı (37 °C'de 1 saat ve 70 °C'de 5 dk).

İkinci aşamada polyA eklenen RNA'lar kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Protokolü;

<u>Komponentler</u>	<u>Hacim</u>
Poly (A) RNA	10 µl
miRNA-cDNA Reaksiyon mixi	9 µl
qScript Revers Transkriptaz	1 µl
Son hacim	20 µl

PCR yapıldı (42 °C'de 20 dk ve 85 °C'de 5 dk).

Üçüncü aşamada cDNA sentezinin kontrolü Rat U6 housekeeping geni kullanılarak Real-Time PCR yöntemiyle gerçekleştirildi. Protokolü:

<u>RT-PCR Karışımı</u>	<u>Hacim</u>
SYBR Green SuperMix (2x)	10 µl
Forward primer (Rat U6)	0.4 µl
Revers primer (Universal PCR primer)	0.4 µl
Nükleaz-free su	8.2 µl
Template (cDNA)	1 µl
Son hacim	20 µl

Pre-inkübasyon/aktivasyon aşamasında 95 °C’de 2 dk, PCR siklusunun (40 siklus) denatürasyon aşamasında 95 °C’de 5 sn, annealing aşamasında 60 °C’de 15 sn, extensionda 70 °C’de 15 sn ve melting curve analizinde 0.5 °C’lik artışlarla 70 °C’den 90 °C’ye inkübasyon uygulanarak 0.2 sn’de bir okuma yapacak şekilde PCR protokolü uygulandı.

Elde edilen cDNA’lar kullanılarak up ya da down regüle olan miRNA’ların kantitasyon analizleri Real-time PCR yöntemiyle yapıldı.

REAL-TİME PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Çalışma, BİORAD-CFX Connect Real-Time PCR sistemi ile Perfecta®® SYBR Green FastMix® Reaction Mixes-VWR kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3: miRNA mikroarray analizinden sonra validasyonda kullanılan genlerin primer dizileri

miRNA'lar	Primer dizileri
rno-miR-194-5p	G TAACAGCAACTCCATGTGG
rno-miR-350	CACAAAGCCCATACTTTC
rno-miR-132-3p	AACAGTCTACAGCCATGGTC
rno-miR-98-5p	GAGGTAGTAAGTTGTATTGT
rno-miR-192-5p	TGACCTATGAATTGACAGC
rno-miR-106b-5p	AAAGTGCTGACAGTGCAGA
rno-miR-466b-2-3p	TATACATACACACATACAC
rno-miR-290	TCTCAAACCTATGGGGGCA
rno-miR-6332	CAGGGACTGCAAGGAGCCG

RT-PCR Karışımı**Hacim**

SYBR Green FASTMix (2x)	7.5 µl
Forward primer	0.3 µl
Revers primer	0.3 µl
Nükleaz-free su	4.9 µl
Template	2 µl
Son hacim	15 µl

PCR karışımından 13 µl alınarak örneklerin üzerine pipetlendi ve amplifikasyon gözlemlendi.

PCR Siklusu Protokolü

Başlangıç denatürasyonu \Rightarrow 95°C 30 s,

PCR siklusu (30-45) \Rightarrow 95°C 10 s,

Extension \Rightarrow 60°C 30 s,

Melting Curve \Rightarrow 60°C'den 95°C'ye 5 s

Real Time-PCR'dan elde edilen sonuçlardan yola çıkarak gen ekspresyonundaki rölâtif değişikliklerin hesaplanmasında Livak'ın delta delta CT ($\Delta\Delta C_T$) metodu kullanıldı. Her bir örnek çift olarak çalışıldı. Housekeeping geni olarak sıçan U6 geni seçildi. Örnekler, U6 ekspresyonu kullanılarak standardize edildi (ΔC_T). Standardize edilen örneklerin rölâtif kantifikasyonu $2^{-\Delta\Delta C_T}$ formülüne göre hesaplandı (215).

3.6 HISTOLOJİK ANALİZLER

Mayer Hematoksilen eozin ve Masson-Goldner ile Boyama

Elde edilen kalp dokularının yarısı %10'luk nötral tamponlanmış formaldehit içerisinde 1 hafta fikse edildi. Fiksasyonun ardından artan alkol serilerinden geçirilerek dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4µm kalınlığında kesitler alındı.

Işık mikroskobu altında histopatolojik olarak skorlamalar yapıldı. Skorum nekroz, kanama ve intersellüler ödem dikkate alınarak yapıldı. Her bir veri için 0: Değişiklik yok; 1: Hafif değişiklik; 2: Orta derecede değişiklik; 3: Şiddetli değişiklik şeklinde değerlendirme yapıldı.

Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesinde Kullanılan TUNEL Yöntemi

Apoptotik hücrelerin belirlenmesinde TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-X nick end labelling assay, Roche- 11 684 795 910-kit) floresan boyama tekniği kullanıldı.

Apoptotik hücre sayısı her bir kesitte X20 büyütmede rastgele seçilen 20 alanda TUNEL pozitif hücreler sayılarak elde edildi.

Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

Prolifere olan hücrelerin nukleus antijenlerinin immünohistokimyasal olarak belirlenmesinde Histostain™-Plus proliferatif hücre çekirdek antijeni (PCNA) boyama kiti (Invitrogen PCNA Staining Kit, Katalog numarası: 93-1143) kullanıldı.

3.7 İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Egzersiz ve kontrol gruplarında ekokardiyografik ölçümlerin analizinde grup içi kıyaslamalarda Wilcoxon Whitney testi ve gruplar arasındaki farklılıkları göstermek için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Her iki gruptan elde edilen kan ve kalp dokularında ekspresyonu belirlenen genlerin istatistiksel değerlendirilmelerinde, non-parametrik testlerden Wilcoxon Whitney ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı.

Kalp dokusunda histopatolojik değişikliklerin önem derecesinin belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı.

İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

4.1 GRUPLARA AIT EKOKARDIYOGRAFIK ÖLÇÜMLERİN SONUCU

Tablo 4: Ekokardiyografiyle kalp fonksiyonunun değerlendirilmesi

Ölçülen parametreler	Egzersiz grubu (n=8)		Kontrol grubu (n=6)	
	Egzersiz öncesi	Egzersiz sonrası	İlk ölçüm	Son ölçüm
Ağırlık (gr)	384,63 ± 8,78 *Δ	352,38 ± 20,74	388,00 ± 26,42 *	411,67± 30,02
IVS (mm)	1,55 ± 0,13 *	1,60 ± 0,14	1,59 ± 0,07	1,58 ± 0,08
LPWT (mm)	1,57 ± 0,12 *	1,61 ± 0,14	1,61 ± 0,10	1,61 ± 0,09
LVDd (mm)	4,70 ± 0,33 * Δ Δ	4,91 ± 0,31	5,24 ± 0,25	5,25 ± 0,32
LVDs (mm)	2,55 ± 0,39 *	2,70 ± 0,35	2,82 ± 0,32	2,85 ± 0,41
LVmass (gr)	0,38 ± 0,06 * Δ	0,43 ± 0,07	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,02
LVEF (%)	76,59 ± 8,01 *	75,81 ± 5,97	76,88 ± 5,48	76,05 ± 7,38

IVS, interventriküler septum kalınlığı, LPWT, posterior duvar kalınlığı, LVDd, sol ventrikül diastolik çapı, LVDs, sol ventrikül sistolik çapı, LVmass, sol ventrikül kütlesi, LVEF, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu. **K**, Kontrol grubu; **E**, Egzersiz grubu, **p < 0.05**.

* : Grup içi kıyaslamaları gösterir.

Δ : Gruplar arası kıyaslamaları gösterir.

* ve Δ: **p < 0,05**

** ve Δ Δ: **p < 0,01**

Egzersiz programı sonrası elektrokardiyografi ölçümünde 1 adet sıçan öldüğü için kayıt alınmadı. Çalışmamızda ekokardiyografi değerlendirmesi yapılan sıçan sayısı 8'dir.

4.2 MOLEKÜLER ANALİZLERİN SONUCU

Egzersiz grubu ve kontrol grubunda yer alan sıçanların tüm genomu mikroarray yöntemiyle tarandı ve kardiyak hipertrofiyle ilgili olabilecek 128 adet miRNA geninin ekspresyonunda farklılık olduğu belirlendi. Bu miRNA'lardan 119 tanesinin upregüle ve 9 tanesinin ise down regüle olduğu görüldü (Tablo 5,6). Tablo 5 ve 6'da miRNA'ların fold change değerleri, regülasyon düzeyleri (up/down) ve erişim numaraları yer almaktadır.

Tablo 5: Upregüle olan miRNA'lar

miRNA'lar	Fold Change	Regülasyon	Erişim numarası
rno-miR-194-5p	15,5	Up	MIMAT0000869
rno-miR-350	13,22	Up	MIMAT0000604
rno-miR-132-3p	11,26	Up	MIMAT0000838
rno-miR-98-5p	10,26	Up	MIMAT0000819
rno-miR-192-5p	9,49	Up	MIMAT0000867
rno-miR-505-3p	7,88	Up	MIMAT0003380
rno-miR-106b-5p	6,13	Up	MIMAT0000825
rno-miR-21-5p	5,78	Up	MIMAT0000790
rno-miR-140-5p	5,69	Up	MIMAT0000573
rno-miR-34a-5p	5,52	Up	MIMAT0000815
rno-miR-20a-5p	5,04	Up	MIMAT0000602
rno-miR-19b-3p	4,64	Up	MIMAT0000788
rno-miR-24-2-5p	4,63	Up	MIMAT0005441
rno-miR-28-5p	4,61	Up	MIMAT0000800
rno-miR-30e-5p	4,6	Up	MIMAT0000805
rno-miR-339-5p	4,56	Up	MIMAT0000583
rno-miR-499-5p	4,44	Up	MIMAT0003381
rno-miR-450a-5p	4,34	Up	MIMAT0001547
rno-miR-490-3p	4,34	Up	MIMAT0012823
rno-miR-872-3p	4,3	Up	MIMAT0005283
rno-miR-125b-2-3p	4,26	Up	MIMAT0026467
rno-miR-1839-5p	4,2	Up	MIMAT0024843

rno-miR-27a-3p	4,11	Up	MIMAT0000799
rno-miR-26b-5p	4,08	Up	MIMAT0000797
rno-miR-7a-1-3p	4,06	Up	MIMAT000607
rno-miR-29b-2-3p	4,03	Up	MIMAT0004717
rno-miR- 22-5p	4	Up	MIMAT00003152
rno-miR-15b-5p	3,96	Up	MIMAT0000784
rno-miR-17-5p	3,91	Up	MIMAT0000786
rno-miR-106b-3p	3,89	Up	MIMAT00004727
rno-miR-451-5p	3,81	Up	MIMAT0001633
rno-miR-503-3p	3,79	Up	MIMAT0017224
rno-miR-342-3p	3,77	Up	MIMAT0000589
rno-miR-133a-5p	3,75	Up	MIMAT0017124
rno-miR-185-5p	3,72	Up	MIMAT0000862
rno-miR-345-3p	3,7	Up	MIMAT0004655
rno-miR-101b-3p	3,61	Up	MIMAT0000615
rno-miR-10a-5p	3,6	Up	MIMAT0000782
rno-miR-30b-5p	3,56	Up	MIMAT0000806
rno-miR-27b-3p	3,55	Up	MIMAT0000798
rno-miR-374-5p	3,55	Up	MIMAT0003208
rno-miR-532-5p	3,55	Up	MIMAT0005322
rno-miR-20b-5p	3,49	Up	MIMAT0003221
rno-miR-30c-1-3p	3,4	Up	MIMAT0004719
rno-miR-425-5p	3,38	Up	MIMAT0005314
rno-miR-143-3p	3,36	Up	MIMAT0000849
rno-miR-146b-5p	3,35	Up	MIMAT0005595
rno-miR-184	3,34	Up	MIMAT0000861
rno-miR-29c-3p	3,33	Up	MIMAT0000803
rno-miR-301a-3p	3,3	Up	MIMAT0000552
rno-miR-200b-3p	3,3	Up	MIMAT0000875
rno-miR-503-5p	3,3	Up	MIMAT0003223
rno-miR-322-5p	3,24	Up	MIMAT0001619
rno-miR-30c-2-3p	3,21	Up	MIMAT0005442

rno-miR-29c-5p	3,1	Up	MIMAT0003154
rno-miR-423-5p	3,03	Up	MIMAT0017305
rno-miR-30a-5p	2,99	Up	MIMAT0000808
rno-miR-30a-3p	2,98	Up	MIMAT0000809
rno-miR-199a-5p	2,96	Up	MIMAT0000872
rno-miR-29b-3p	2,93	Up	MIMAT0000801
rno-miR-322-3p	2,92	Up	MIMAT0000547
rno-miR-181c-5p	2,9	Up	MIMAT0000857
rno-miR-28-3p	2,88	Up	MIMAT0004716
rno-miR-93-5p	2,86	Up	MIMAT0000817
rno-miR-511-3p	2,86	Up	MIMAT0017358
rno-miR-148b-3p	2,79	Up	MIMAT0000579
rno-miR-7a-5p	2,74	Up	MIMAT0000606
rno-miR-24-3p	2,66	Up	MIMAT0000794
rno-miR-222-3p	2,63	Up	MIMAT0000891
rno-miR-352	2,61	Up	MIMAT0000610
rno-miR-532	2,6	Up	MI0006154
rno-miR-151-5p	2,59	Up	MIMAT0000613
rno-miR-25-3p	2,59	Up	MIMAT0000795
rno-miR-30d-5p	2,56	Up	MIMAT0000807
rno-miR-152-3p	2,51	Up	MIMAT0000854
rno-miR-122-5p	2,49	Up	MIMAT0000827
rno-miR-195-5p	2,46	Up	MIMAT0000870
rno-miR-30c-5p	2,45	Up	MIMAT0000804
rno-miR-100-5p	2,38	Up	MIMAT0000822
rno-miR-130a-3p	2,35	Up	MIMAT0000836
rno-miR-181d-5p	2,35	Up	MIMAT0005299
rno-miR-107-3p	2,34	Up	MIMAT0000826
rno-miR-378a-3p	2,34	Up	MIMAT0003379
rno-miR-191a-5p	2,33	Up	MIMAT0000866
rno-miR-351-5p	2,32	Up	MIMAT0000608
rno-miR-16-5p	2,32	Up	MIMAT0000785
rno-miR-128-3p	2,32	Up	MIMAT0000834

rno-miR- let-7i-5p	2,31	Up	MIMAT0000779
rno-miR-378b	2,29	Up	MIMAT0024855
rno-miR-497-5p	2,28	Up	MIMAT0003383
rno-miR-344a-2	2,28	Up	MI0015432
rno-miR-212-3p	2,25	Up	MIMAT0000883
rno-miR-1839-3p	2,25	Up	MIMAT0024844
rno-miR-99a-5p	2,24	Up	MIMAT0000820
rno-miR-26a-5p	2,23	Up	MIMAT0000796
rno-miR-155-5p	2,23	Up	MIMAT0030409
rno-miR-22-3p	2,22	Up	MIMAT0000791
rno-miR-30b-3p	2,21	Up	MIMAT0004721
rno-miR-146a-5p	2,21	Up	MIMAT0000852
rno-miR-532-3p	2,21	Up	MIMAT0005323
rno-miR-30e-3p	2,2	Up	MIMAT0004720
rno-miR-103-3p	2,2	Up	MIMAT0000824
rno-miR-126a-3p	2,19	Up	MIMAT0000832
rno-miR-361-5p	2,18	Up	MIMAT0003117
rno-miR-324-5p	2,17	Up	MIMAT0000553
rno-miR-221-3p	2,16	Up	MIMAT0000890
rno-miR-let-7f-5p	2,12	Up	MIMAT0000778
rno-miR-199a-3p	2,12	Up	MIMAT0004738
rno-miR-27b-5p	2,11	Up	MIMAT0017101
rno-miR-127-3p	2,11	Up	MIMAT0000833
rno-miR-208a-5p	2,09	Up	MIMAT0017155
rno-miR-125a-3p	2,07	Up	MIMAT0004729
rno-miR-140-3p	2,06	Up	MIMAT0000574
rno-miR-19a-3p	2,06	Up	MIMAT0000789
rno-miR-29a-3p	2,06	Up	MIMAT0000802
rno-miR-145-3p	2,06	Up	MIMAT0017131
rno-miR-23a-3p	2,05	Up	MIMAT0000792
rno-miR-92a-3p	2,05	Up	MIMAT0000816
rno-miR-25	2,04	Up	MI0000856

Tablo 6: Down regüle olan miRNA'lar

miRNA'lar	Fold Change	Regülasyon	Erişim numarası
rno-miR-6324	-2,05	Down	MIMAT000025063
rno-miR-326-5p	-2,09	Down	MIMAT0017028
rno-miR-935	-2,09	Down	MI0012607
rno-miR-92b-3p	-2,1	Down	MIMAT0005340
rno-miR- 365-5p	-2,35	Down	MIMAT0017184
rno-miR-6332	-2,41	Down	MIMAT0025073
rno-miR-290	-2,42	Down	MIMAT0000893
rno-miR-667-3p	-2,79	Down	MIMAT0012852
rno-miR-466b-2-3p	-3,67	Down	MIMAT0017286

Yapılan mikroarray analizinden elde edilen Fold change ≥ 2 ve $p < 0.05$ değerleri ve bilgi bankalarında yer alan biyoinformatik analizler dikkate alınarak; en fazla upregüle olan miRNA'lardan 6 tane ve en fazla down regüle olan miRNA'lardan ise 3 tane olmak üzere toplam 9 adet miRNA geni seçildi (Tablo 7)

Tablo 7: Ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için seçilen miRNA'lar

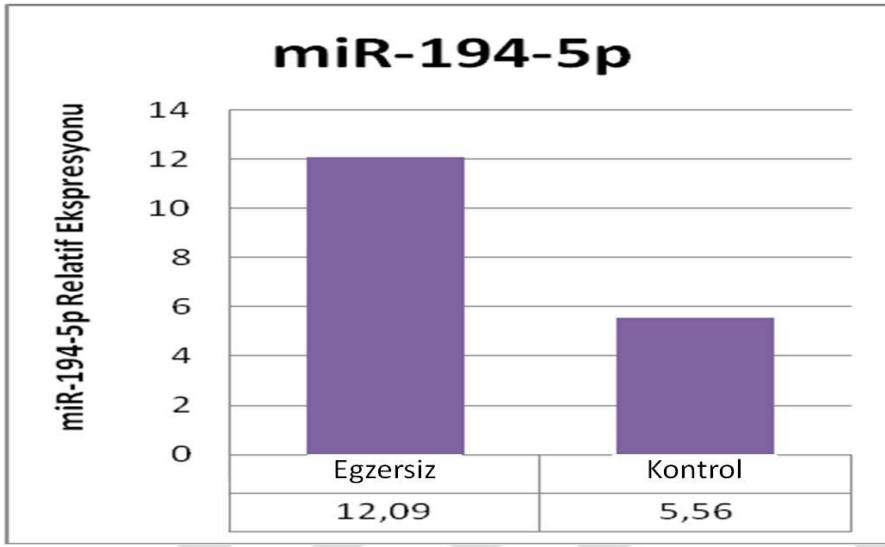
miRNA'lar	Fold Change	Regülasyon (Up/Down)
rno-mir-194-5p	15,5	Up
rno-mir-350	13,22	Up
rno-mir-132-3p	11,26	Up
rno-mir-98-5p	10,26	Up
rno-miR-192-5p	9,49	Up
rno-miR-106b-5p	6,13	Up
rno-miR-466b-2-3p	-3,67	Down
rno-miR-290	-2,42	Down
rno-miR-6332	-2,41	Down

Tablo 8: Ekspresyonları değerlendirilen miRNA'ların Hedef Genlerinin Belirlenmesinde Bilgi Bankalarından Elde Edilen Veriler (miRBase, mirwalk, Qiagen IPA)

miRNA	Hedef genleri
rno-miR-132-3p	Rasa1, Pten, Mmp9 , Mecp2, Grin2a, Capn8, Arhgap32
rno-miR-290	Vsn11, Tagln, Syne1, Stx1a, Ssr3, Sept3, Rcan1, Ptp4a2, Ptges, Ogt, Nr4a1, Mmp9, Mgst1, Mapre1, Mapk1, Klf15 , Golph3, Gnb1, Gmfb, Fgf16, Dclk1, Cntn4, Capn8, Arc, Akap6, Adora1, Acvr1
rno-miR-194-5p	Ifitm3, Rtn4, Fabp3, UBR5, Ubr5, Hrt1, Cast, Human Endotelin 3, Ldhd, Prkab, Hrat13, Hrat17, Hrat5, Hrat56, Hrat92, Lbh, Hand1 , Hand2 , Heg1, Hras, Myo9b, Sgk223, Fabp3-ps1, Fabp3-rs2, Fabp3-rs3, Kras, Pom121L2, Rras, Svop1, Atp1f1, Kras2-rs1, Kras2-rs2, LOC441081, LOC728488, LOC728506, Syngap1, Krasp1, Linc-rbe, Catumaxon

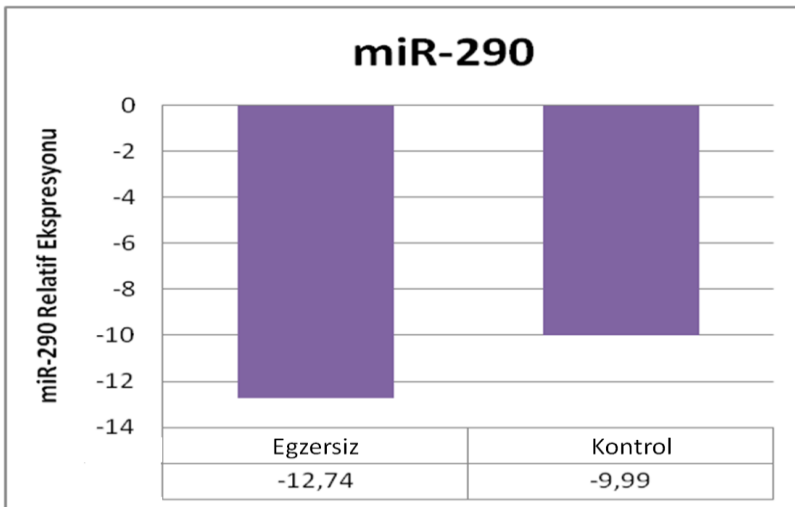
Genlerin ekspresyon düzeylerine, bilgi bankalarına ve literatür taramalarına bakılarak miRNA'ların hedef genleri belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre; miR-132-3p'nin hedef geni Mmp9, miR-290'nin hedef geni Klf15 ve miR-194-5p'nin hedef genlerinin ise Hand1 ve Hand2 genleri olduğunu düşünmekteyiz.

RT-PCR sonuçlarına göre fizyolojik kardiyak hipertrofiyle ilgili kalp dokusunda 2 tane miRNA geninin (miR-194-5p ve miR-290) ekspresyonunda farklılık olduğunu gözlemledik. miR-194-5p'nin ekspresyonununun egzersiz grubunda kontrol grubuna göre 92 kat upregüle olduğunu gösterdik (Şekil 16).



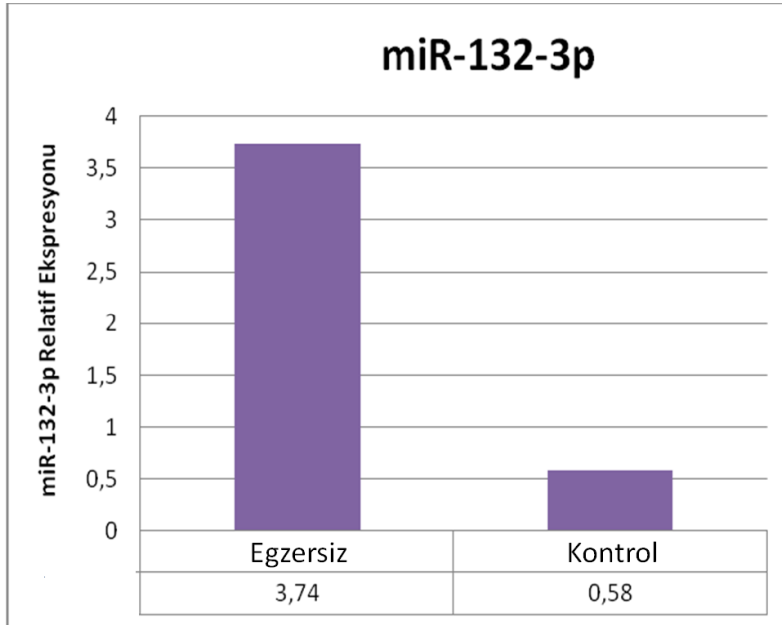
Şekil 16: miR-194-5p'nin kalp dokusunda ekspresyon düzeyini göstermektedir (p=0.0027)

miR-290'nin ekspresyonununun egzersiz grubunda kontrol grubuna göre 6,7 kat downregüle olduğunu gösterdik (Şekil 17).



Şekil 17: miR-290'nın kalp dokusunda ekspresyon düzeyini göstermektedir (p=0.0048).

Dolaşımda bulunan miR-132-3p'nin ekspresyonunun egzersiz grubunda kontrol grubuna göre 16,6 kat upregüle olduğunu gösterdik (Şekil 18).



Şekil 18 : miR-132-3p'nin kalp dokusunda ekspresyon düzeyini göstermektedir (p= 0.012).

Kalp Dokusu CT Analiz Sonuçları

Tablo 9 ve 17’te kalpte ekspresyonları değerlendirilen 9 tane miRNA geninin Real-Time PCR sonuçları ve ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi görülmektedir.

1. miR-194-5p

Tablo 9: * miR-194-5p ekspresyon düzeyi p=0.0027

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	19,33	19,33	0	28,33	21,34	6,99		
	20,33	17,27	3,06	29,33	19,64	9,69		
	21,33	18,09	3,24	30,33	19,51	10,82		
	22,33	19,30	3,03	31,33	17,25	14,08		
miR-194-5p	23,33	17,20	6,13	32,33	16,93	15,4	-6,53	* 92 (Kat Up)
	24,33	17,38	6,95	33,33	17,76	15,57		
	25,33	16,67	8,66					
	26,33	17,08	9,25					
	27,33	17,65	9,68					
Ort	23,33	17,77	5,56	30,83	18,74	12,09		

2. miR-350

Tablo 10: miR-350 ekspresyon düzeyi $p=0.45$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	20,13	19,33	0,80	23,31	21,34	1,97		
	18,10	17,27	0,83	22,24	19,64	2,6		
	21,28	18,09	3,19	20,17	19,51	0,66		
	18,75	19,30	-0,55	19,27	17,25	2,02		
miR-350	19,89	17,20	2,69	18,36	16,93	1,43	0,52	
	19,30	17,38	1,92	16,73	17,76	-1,03		
	18,98	16,67	2,31					
	18,92	17,08	1,84					
	20,78	17,65	3,13					
Ort	19,57	17,77	1,79	20,01	18,74	1,27		

3. miR-132-3p

Tablo 11: miR-132-3p ekspresyon düzeyi $p=0.181$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	22,42	19,33	3,09	23,75	21,34	2,41		
	23,69	17,27	6,42	23,05	19,64	3,41		
	23,91	18,09	5,82	23,39	19,51	3,87		
	22,00	19,30	2,70	24,44	17,25	7,19		
miR-132-3p	23,87	17,20	6,67	22,41	16,93	5,48	1,21	
	24,58	17,38	7,20	22,78	17,76	5,02		
	24,26	16,67	7,59					
	23,61	17,08	6,53					
	23,56	17,65	5,91					
Ort	23,54	17,77	5,77	23,31	18,74	4,56		

4. miR-98-5p

Tablo 12: miR-98-5p ekspresyon düzeyi $p=0.455$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	20,14	19,33	0,81	23,32	21,34	1,98		
	18,10	17,27	0,83	22,24	19,64	2,60		
	21,28	18,09	3,19	20,18	19,51	0,67		
	18,76	19,30	-0,55	19,28	17,25	2,03		
miR-98-5p	19,90	17,20	2,70	18,37	16,93	1,44	0,52	
	19,30	17,38	1,92	16,73	17,76	-1,03		
	18,99	16,67	2,31					
	18,93	17,08	1,84					
	20,79	17,65	3,13					
Ort	19,58	17,77	1,80	20,02	18,74	1,28		

5. miR-192-5p

Tablo 13: miR-192-5p ekspresyon düzeyi $p=0.77$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	32,81	19,34	13,47	34,13	21,34	12,79		
	31,04	17,28	13,76	35,92	19,64	16,28		
	32,02	18,09	13,93	34,10	19,51	14,59		
	32,24	19,30	12,93	29,27	17,25	12,02		
miR-192-5p	30,54	17,20	13,34	29,78	16,93	12,85	-0,46	
	32,36	17,38	14,98	34,47	17,76	16,71		
	32,16	16,67	15,49					
	30,45	17,08	10,86					
	30,04	17,65	12,39					
Ort	31,52	17,77	13,74	32,95	18,74	14,21		

6. miR-106b-5p

Tablo 14: miR-106b-5p ekspresyon düzeyi $p=0.60$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	25,40	19,33	6,07	28,37	21,34	7,03		
	24,59	17,27	7,32	26,47	19,64	6,83		
	25,64	18,09	7,55	26,51	19,51	7,00		
	25,06	19,30	5,76	26,15	17,25	8,90		
miR-106b-5p	27,08	17,20	9,88	24,74	16,93	7,81	0,80	
	27,04	17,38	9,66	24,83	17,76	7,07		
	26,80	16,67	10,13					
	23,73	17,08	6,65					
	28,79	17,65	11,14					
Ort	26,01	17,77	8,24	26,18	18,74	7,44		

7. miR-466b2-3p

Tablo 15: miR-466b2-3p ekspresyon düzeyi $p=0.18$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	29,45	19,33	10,12	29,29	21,34	7,95		
	29,29	17,27	12,02	30,23	19,64	10,59		
	30,16	18,09	12,07	27,20	19,51	7,69		
	29,67	19,30	10,37	28,89	17,25	11,64		
miR-466b2-3p	29,62	17,20	12,42	29,76	16,93	12,83	1,50	
	29,48	17,38	12,10	29,11	17,76	11,35		
	30,64	16,67	13,97					
	28,56	17,08	11,48					
	29,62	17,65	11,97					
Ort	29,61	17,77	11,84	29,08	18,74	10,34		

8. miR-290

Tablo 16: * miR-290 ekspresyon düzeyi $p=0.0048$ ($p<0.05$).

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT(Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	32,67	19,33	13,34	30,30	21,34	8,96		
	30,43	17,27	13,16	30,05	19,64	10,41		
	31,22	18,09	13,13	27,54	19,51	8,03		
	29,40	19,30	10,10	28,38	17,25	11,13		
miR-290	28,83	17,20	11,63	27,68	16,93	10,75	2,75	* 6,7 (kat down)
	31,32	17,38	13,94	28,40	17,76	10,64		
	29,32	16,67	12,65					
	30,38	17,08	13,30					
	31,08	17,65	13,43					
Ort	30,52	17,77	12,74		18,74	9,99		

9. miR-6332

Tablo 17: miR-6332 ekspresyon düzeyi $p=0,18$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	29,45	19,33	10,12	29,29	21,34	7,95		
	29,29	17,27	12,02	30,23	19,64	10,59		
	30,16	18,09	12,07	27,20	19,51	7,69		
	29,67	19,30	10,37	28,89	17,25	11,64		
miR-6332	29,62	17,20	12,42	29,76	16,93	12,83	1,50	
	29,48	17,38	12,10	29,11	17,76	11,35		
	30,64	16,67	13,97					
	28,56	17,08	11,48					
	29,62	17,65	11,97					
Ort	29,61	17,77	11,84	29,08	18,74	10,34		

2. miR-350

Tablo 19: miR -350 serum ekspresyon düzeyi $p=0,26$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT(EU6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (KU6)	$\Delta\Delta$ CT(Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
miR-350	30,17	30,39	-0,22	38,42	29,68	8,74		
	32,26	30,24	2,02	40,21	29,32	10,89		
	34,54	30,67	3,87	35,89	28,97	6,92		
	37,01	30,37	6,64	38,24	30,03	8,21		
	37,50	29,96	7,54	29,98	29,98	0,00	-2,62	
	38,07	29,70	8,37	35,50	29,51	5,99		
	40,12	30,77	9,35					
	30,59	30,59	0,00					
	29,87	29,87	0,00					
Ort	34,46	30,28	4,17	36,37	29,58	6,79		

3. miR-132-3p

Tablo 20: * miR-132-3p serum ekspresyon düzeyi $p=0,011$.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
miR-132-3p	29,79	30,39	-0,60	34,51	29,68	0,00		
	28,58	30,24	-1,65	30,70	29,32	1,38		
	25,26	30,67	-5,41	29,46	28,97	0,49		
	27,03	30,37	-3,34	28,98	30,03	-1,06		
	29,17	29,96	-0,80	28,26	29,98	-1,71	-4,05	* 16,6 (kat up)
	23,85	29,70	-5,85	29,09	29,51	-0,42		
	29,56	30,77	-1,21					
	21,90	30,59	-8,69					
	26,16	29,87	-3,71					
Ort	26,81	30,28	-3,47	30,17	29,58	0,58		

4. miR-98-5p

Tablo 21: miR-98-5p serum ekspresyon düzeyi $p=0,14$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	33,66	30,39	3,27	33,80	29,68	4,12		
	31,23	30,24	0,99	32,13	29,32	2,81		
	33,11	30,67	2,44	32,93	28,97	3,96		
	26,67	30,37	-3,70	33,06	30,03	3,02		
miR-98-5p	34,48	29,96	4,52	32,70	29,98	2,72	-1,54	
	32,71	29,70	3,01	34,44	29,51	4,93		
	33,49	30,77	2,72					
	31,93	30,59	1,34					
	33,85	29,87	3,98					
Ort	32,35	30,28	2,06	33,18	29,58	3,60		

5. miR-192-5p

Tablo 22: miR-192-5p serum ekspresyon düzeyi $p=0,22$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	30,06	30,39	-0,33	31,96	29,68	2,28		
	30,13	30,24	-0,11	28,76	29,32	-0,56		
	30,82	30,67	0,16	27,56	28,97	-1,41		
	33,37	30,37	3,00	30,19	30,03	0,15		
miR-192-5p	31,47	29,96	1,51	30,08	29,98	0,10	0,77	
	32,54	29,70	2,85	30,86	29,51	1,35		
	31,21	30,77	0,44					
	32,72	30,59	2,13					
	30,04	29,87	0,17					
Ort	31,38	30,28	1,09	29,90	29,58	0,32		

6. miR-106b-5p

Tablo 23: miR-106b-5p serum ekspresyon düzeyi $p=1,00$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	32,19	30,39	1,80	30,45	29,68	0,77		
	31,41	30,24	1,17	37,62	29,32	8,30		
	37,09	30,67	6,42	32,61	28,97	3,64		
	34,06	30,37	3,69	32,68	30,03	2,64		
miR-106b-5p	33,15	29,96	3,19	32,37	29,98	2,40	-0,2	
	31,03	29,70	1,33	32,06	29,51	2,55		
	32,13	30,77	1,36					
	33,88	30,59	3,30					
	36,27	29,87	6,40					
Ort	33,47	30,28	3,18	32,96	29,58	3,38		

7. miR-466b2-3p

Tablo 24: miR-466b2-3p serum ekspresyon düzeyi $p=0,22$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
	27,35	30,39	-3,04	28,41	29,68	-1,27		
	27,07	30,24	-3,17	28,82	29,32	-0,50		
	27,21	30,67	-3,46	27,07	28,97	-1,89		
	27,17	30,37	-3,20	26,77	30,03	-3,26		
miR-466b2-3p	27,49	29,96	-2,47	26,34	29,98	-3,63	-0,83	
	26,98	29,70	-2,72	27,36	29,51	-2,15		
	26,90	30,77	-3,87					
	28,66	30,59	-1,93					
	27,19	29,87	-2,67					
Ort	27,34	30,28	-2,95	27,46	29,58	-2,12		

8. miR-290

Tablo 25: miR-290 serum ekspresyon düzeyi $p=0,87$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
miR-290	26,72	30,39	-3,68	30,38	29,68	0,70	-0,22	
	31,16	30,24	0,92	29,32	29,32	0,00		
	30,67	30,67	0,00	29,45	28,97	0,48		
	31,70	30,37	1,33	28,66	30,03	-1,38		
	29,96	29,96	0,00	30,77	29,98	0,79		
	28,32	29,70	-1,38	31,09	29,51	1,58		
	33,62	30,77	2,85					
	32,45	30,59	1,86					
	29,25	29,87	-0,62					
	Ort	30,43	30,28	0,14	29,94	29,58		

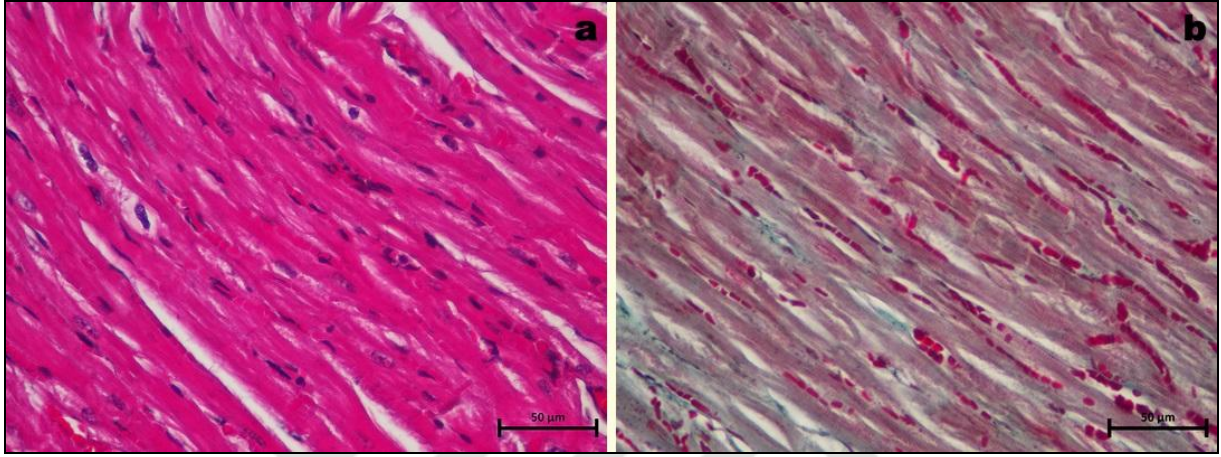
9. miR-6332

Tablo 26: miR-6332 serum ekspresyon düzeyi $p=0,86$ olduğu için gruplar arasında farklılık bulunmamaktadır.

miRNA	E (CT)	U6/E (CT)	Δ CT (E-U6)	K (CT)	U6/K (CT)	Δ CT (K-U6)	$\Delta\Delta$ CT (Ort. Δ CTE-Ort. Δ CTK)	2- $\Delta\Delta$ CT
miR-6332	28,84	30,39	-1,55	29,72	29,68	0,04	-0,19	
	28,26	30,24	-1,98	28,83	29,32	-0,49		
	29,84	30,67	-0,83	27,41	28,97	-1,56		
	28,81	30,37	-1,56	26,35	30,03	-3,69		
	28,42	29,96	-1,54	26,33	29,98	-3,65		
	28,79	29,70	-0,91	26,72	29,51	-2,80		
	26,52	30,77	-4,25					
	25,61	30,59	-4,97					
	27,58	29,87	-2,29					
	Ort	28,08	30,28	-2,21	27,56	29,58		

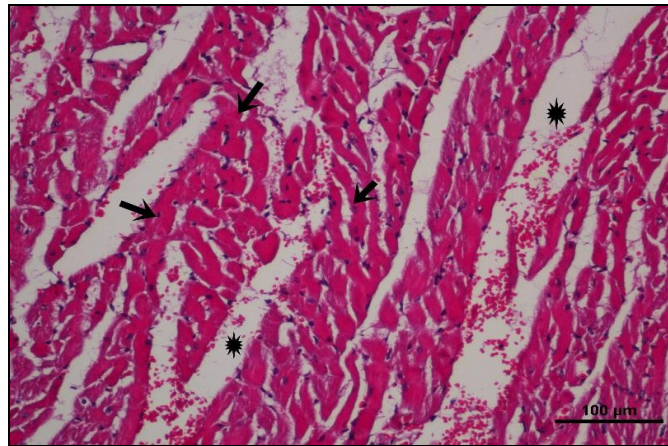
4.3 HİSTOLOJİK ANALİZ SONUÇLARI

Hematoksilen-eozin ve masson trikrom boyama sonuçlarına göre; kontrol grubunda kalp kası hücrelerinin normal histolojik özelliklerini korudukları görüldü. Bu grupta herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Şekil 19a, 19b).



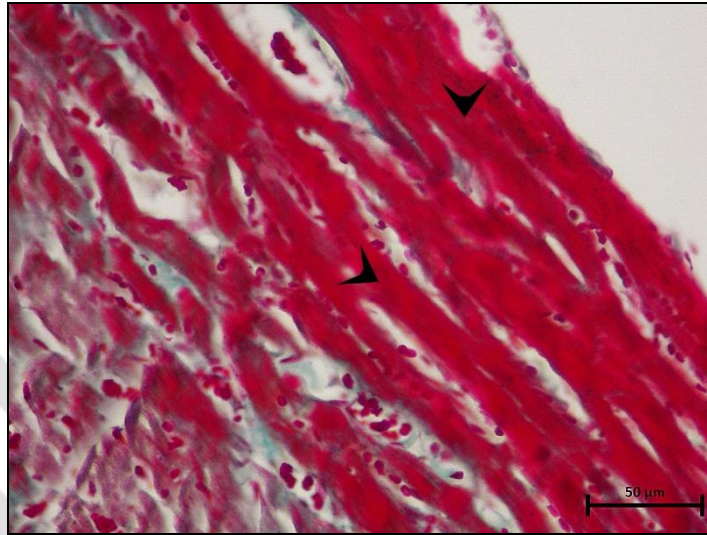
Şekil 19: Kontrol grubuna ait kalp dokularının normal histolojik görünümde olduğu görülmektedir (a. Hematoksilen eozin, X 40 b. Masson trikrom boyama, X 40)

Egzersiz grubunda ise nekroz, kanama ve intersellüler ödem saptandı. Hematoksilen ve eozin boyama yöntemleri ile nekroza giden hücrelerin sitoplazmalarının sağlıklı kalp kası hücrelerine oranla daha koyu asidofilik boyandığı, nükleuslarının piknotik veya soluk olduğu görüldü (Şekil 20).



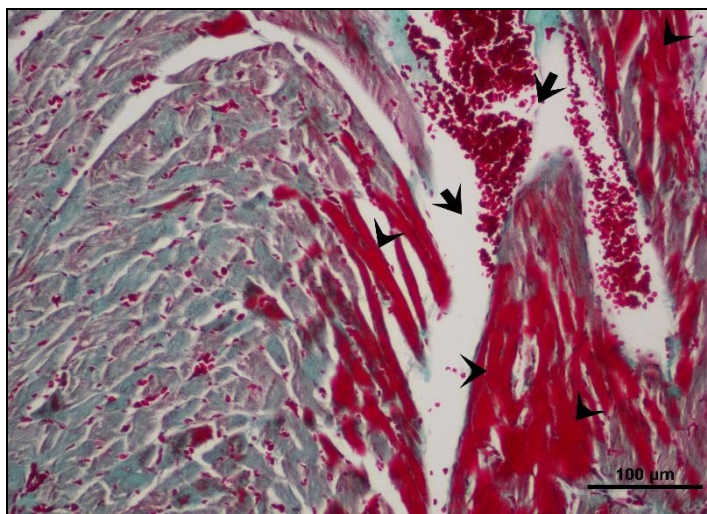
Şekil 20: Egzersiz grubunda kalp dokusunda kanama ve ödem (yıldız) ile nekrotik alanlar (oklar) görülmektedir (Hematoksilen eozin boyama, X 20).

Masson trikrom yöntemiyle ise egzersiz grubundaki sağlıklı hücrelerin soluk boyandığı, nekroza giden hücrelerin ise aksine koyu kırmızı boyandığı görüldü. Bu hücrelerde genellikle nükleuslar ayırt edilemedi (Şekil 21).

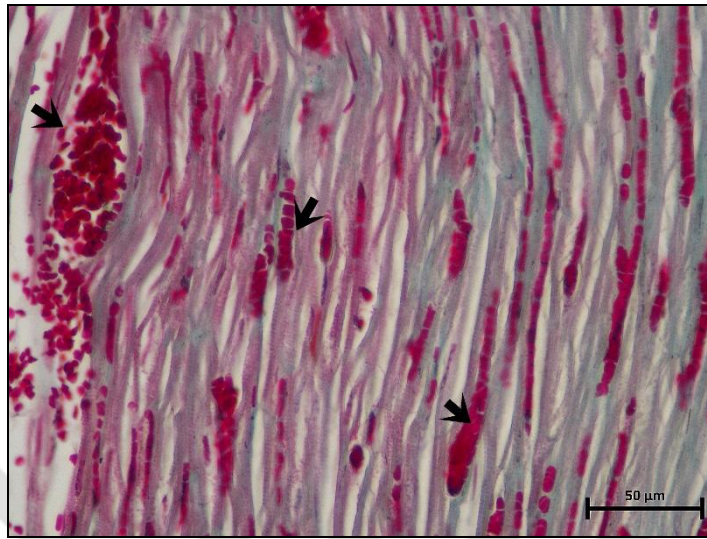


Şekil 21: Egzersiz grubunda kalp dokusunda nekrotik alanlar (ok başları) görülmektedir (Masson trikrom boyama, X40).

Kas liflerinin arasında yoğun kanama ve ödem alanlarının olduğu görüldü. Ödem ve kanama nedeni ile kas liflerinin birbirlerinden uzaklaştığı izlendi (Şekil 22). Ayrıca kesitlerde yer yer konjesyona rastlandı (Şekil 23).

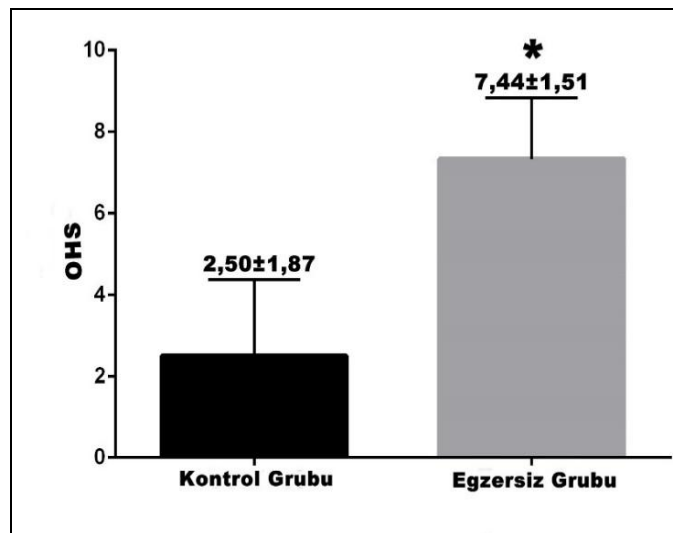


Şekil 22: Egzersiz grubunda kalp dokusunda yoğun kanama ve ödem alanları (okları) ile nekrotik alanlar (ok başları) görülmektedir (Masson trikrom boyama, X20)



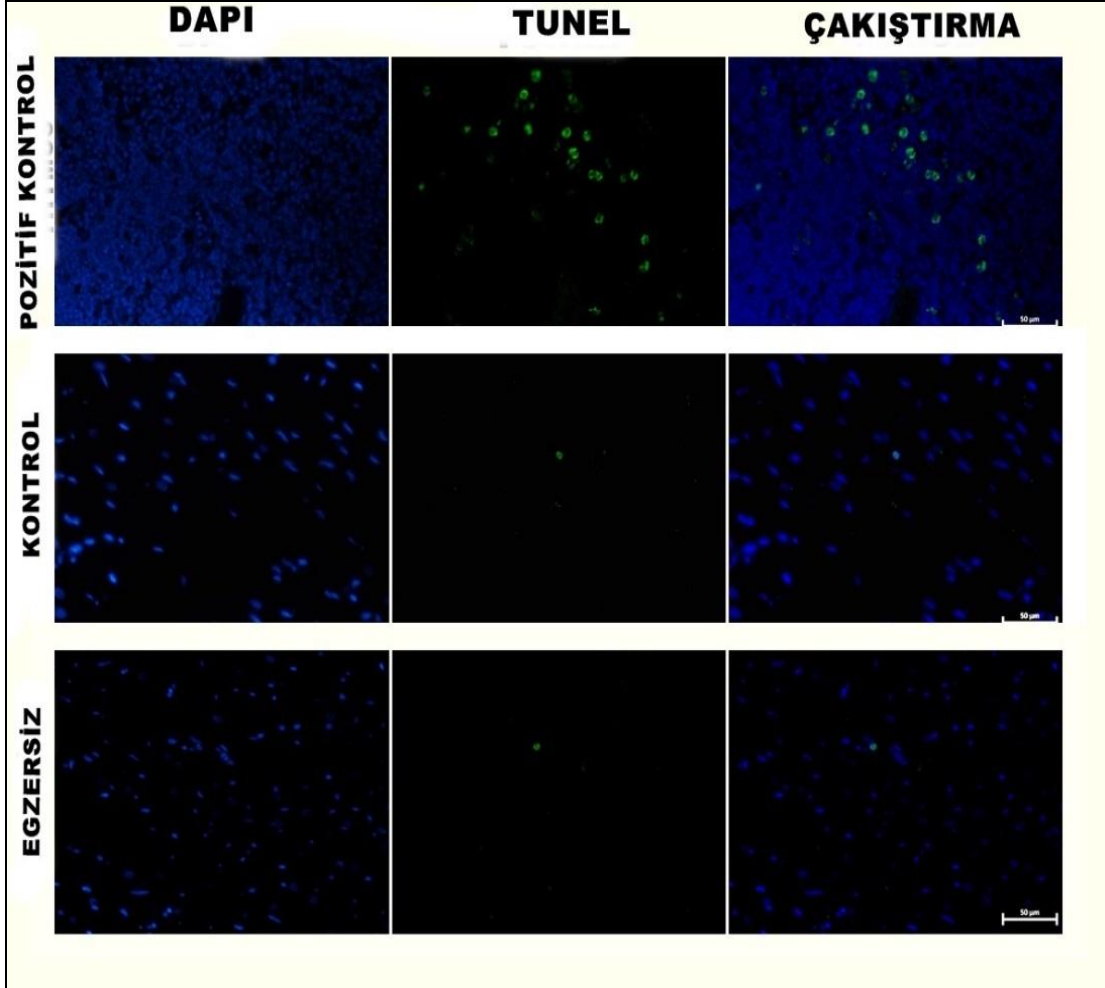
Şekil 23: Egzersiz grubunda kalp dokusunda konjesyon (oklar) görülmektedir (Masson trikrom boyama, X40).

Kanama, ödem ve nekroz bulguları incelenerek histopatolojik skorlama yapıldı. Ortalama histopatolojik skor (OHS) kontrol grubunda $2,50 \pm 1,87$, egzersiz grubunda $7,44 \pm 1,51$ olarak hesaplandı (Şekil 24) ($p=0,03$).



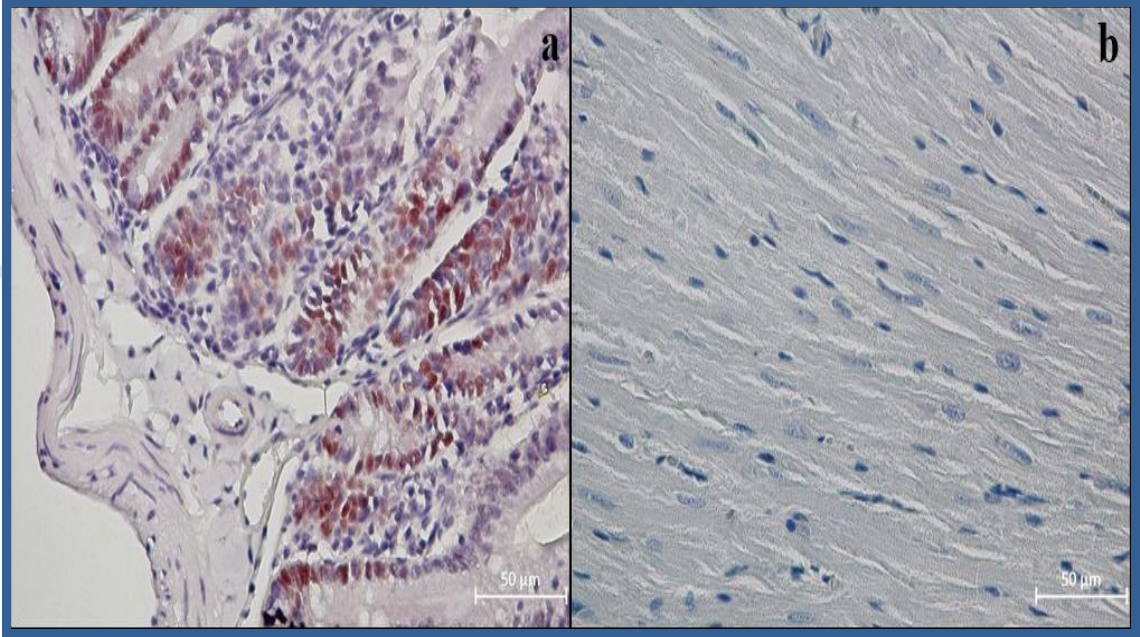
Şekil 24: Kontrol ve egzersiz gruplarında ortalama histopatolojik skora ait bar grafiği (*: $p=0,03$).

Apoptozun gösterilmesi için yapılan TUNEL boyama sonucunda kontrol ve egzersiz grubunda nadiren pozitif hücreye rastlandı. Her bir grupta kesit başına ortalama 6-7 hücreye rastlandı. Bu nedenle egzersizin apoptoz yoluyla hücre ölümüne yol açmadığı sonucuna varıldı (Şekil 25).



Şekil 25: Kalp hücrelerinde TUNEL floresan boyama tekniği ile apoptotik hücrelerin görünümü. Tüm hücreler mavi, TUNEL pozitif hücreler yeşil boyandı.

Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi için yapılan histolojik analizde; kontrol ve egzersiz gruplarının her ikisinde de kalp kası hücrelerinde PCNA pozitif hücelere rastlanmadı. Bu nedenle egzersizin kalp kası hücelerinde proliferasyona yol açmadığı sonucuna varıldı (Şekil 26).



Şekil 26: PCNA pozitif hücelerin ışık mikroskopik görünümü (Büyütme: 40x). (a) Pozitif kontrol olarak değerlendirilen fare bağırsak kesitinde PCNA pozitif hücelere koyu kahverengi boyandı. (b) Egzersiz grubuna ait kalp kası kesitlerinde PCNA pozitif hücelere rastlanmadı.

5. TARTIŞMA

Kalbin aktivitesi srasındaki fonksiyonel strese bağlı olarak hipertrofik büyüme cevabının oluşumunu miRNA'lar pozitif ya da negatif olarak düzenlenmektedir.

Bu nedenle miRNA'ların yer aldığı yolların tanımlanması, hipertrofi mekanizmasının anlaşılması için son derece değerlidir. Diğer yandan miRNA'lar etkilerini hedef genleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir ve hedef genlerin belirlenmesi de KH'de bulunan yolların tanımlanması adına önem arz etmektedir.

Aerobik egzersizle oluşturulan fizyolojik kardiyak hipertrofide yer alan miRNA'lara ait rollerin araştırılmasına dönük ilk çalışma 2011 yılında gerçekleştirilmiştir (212). Fernandes ve ark.'nın yaptıkları bu çalışmada sıçanlar; sedanter, Egzersiz 1 (E1) ve Egzersiz 2 (E2) gruplarına ayrılmıştır. E1 grubuna; düşük şiddet ve uzun süreli, (60dk/5 gün/10 hafta) yüzme egzersiz programı uygulanmıştır. E2 grubuna ise düşük şiddet ve daha uzun süreli egzersiz programı uygulanmıştır. E2 grubunun programı 8 hafta süreyle haftanın 5 gün ve günde 1x60 dk'a olup, 9. haftada günde 2x60 dk'ya ve 10. haftada ise günde 3x60 dk'ya çıkarılarak tamamlanmıştır. E1 grubuna uygulanan egzersiz programında; kardiyovasküler adaptasyonların uyarılması ve özellikle kasların oksidatif kapasitesinin artırılması hedeflenmiştir. Egzersiz süresinin artırıldığı E2 grubundaki programda, kardiyak hipertrofi oranındaki artışın ve aerobik performanstaki yükselişin gösterilmesi hedeflenmiştir (212).

Biz de yaptığımız bu çalışmada Fernandes'in yaptığı deney sonuçlarından yola çıkarak sıçanlarda fizyolojik kardiyak hipertrofi oluşturmak için E2 egzersiz protokolü tercih edildi.

Fernandes çalışmasında; egzersiz protokolünü tamamladıktan sonra sistolik ve diyastolik fonksiyonları değerlendirmek için ekokardiyografi yöntemini kullanmıştır. Egzersiz grupları ve kontrol grubu arasında sistolik fonksiyon açısından farklılığın olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca egzersiz yapan sıçanlarda ventriküler kompliyansın geliştiği gösterilmiştir (212).

Çalışmamızda hipertrofik gelişmeye ait takip göstergelerinden ilki egzersiz programı öncesi ve sonrası yapılan ekokardiyografik ölçümlerdir. Egzersiz grubunun kendi içinde ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığı ölçümlerinde; sol ventrikülün kütleinde, sol ventrikülün diyastol sonu çapında, sol ventrikülün sistol sonu çapında, posterior duvarın kalınlığında ve interventriküler septumun kalınlığında anlamlı artışlar olduğu tespit edildi (Tablo 4).

Maron ve ark. ise yaptıkları bir çalışmada sporculara ait sol ventrikül kütlelerinin, diyastol sonu çapının, sistol sonu çapının ve posterior duvar kalınlığının kontrol grubuna göre arttığını göstermiştir (216). Çalışmamızda egzersiz grubunun % EF'nin değerinde kontrol grubuna göre bir farklılık saptanmadı (Tablo 4). Fernandes'in çalışmasında da EF'de değişiklik olmadığı gösterilmiştir (215). Sporcularda sistolik fonksiyonun göstergesi olan EF değeriyle ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde Mayor; sporcuların büyük bir kısmında EF'nin normal sınırlar içinde olduğunu (216), Rerych ve ark., yüzücülerde EF'nin azaldığını (217) ve Stein ve ark. ise, egzersizden sonra EF'nin hafifçe arttığını göstermişlerdir (218). Bizim çalışmamızda egzersiz grubunun % EF değeri egzersiz programı sonrası anlamlı olarak azalmış (Tablo 4) olup Rerych ve ark'larının çalışması ile uyumlu görünmektedir.

Çalışmamızda kalbe ait hipertrofik gelişmenin ikinci takip göstergesi olarak hücre proliferasyonu değerlendirildi. Kontrol ve egzersiz grubunda belirgin bir proliferasyona rastlanmadığı görüldü. Çalışmamızda meydana gelen KH'nin hücre sayısında değişiklik oluşturmadan; kardiyomiyositlerin alanında ve genişliğinde artmaya neden olduğu gösterildi (Şekil 26). Proliferasyonun devam etmesi patolojik hipertrofiyle sonuçlanacağı düşünüldüğünde bizim elde ettiğimiz sonuçların fizyolojik kardiyak hipertrofiyle uyumlu olduğunu söyleyebiliriz. Yetişkin kalbinde kardiyomiyositlerin %1'lik kısmında proliferasyonun olduğu bilinmektedir (142). Bu bağlamda proliferasyonun değerlendirildiği histolojik tetkiklere ait analiz sonuçlarımızın literatürle uyumlu olduğunu düşünüyoruz.

Fernandes ve ark., iki farklı yüzme egzersizi uyguladığı sıçanlardan elde ettiği kalp dokularından mikroarray yöntemiyle miRNA analizi yapmış ve her bir mikroarray 349 farklı miRNA'dan oluşmuştur. Kontrol grubuyla kıyaslandığında bu 349 miRNA'dan 87 tanesinin farklı şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir. 87 miRNA'dan 48'i upregüle olurken, 39'u downregüle olmuştur. Farklı şekilde eksprese olan miRNA'lardan miR-1, 133a, 133b, 29a, 29b ve 29c seçilmiştir. Bu genlerin daha önce yapılan çalışmalarda patolojik ve strese bağlı olarak oluşan kardiyak hipertrofide yer aldıkları gösterilmiştir (219-221). E1 ve E2 egzersiz grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; miR-1, 133a ve 133b'nin ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir (219). miR-29b'nin ekspresyonuna bakıldığında gruplar arasında herhangi bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Egzersiz gruplarında, miR-29a'nın ve miR-29c'nin ekspresyonlarının arttığı belirtilmiştir. Ekspresyon paternlerinde görülen bu değişikliklerin patolojik hipertrofinin düzenlenmesinde yer aldığı görülmüştür (221,222). Mikroarray analizinden elde edilen sonuçlara göre; miR-1, 133a, 133b ve 29c'nin ekspresyon düzeyleri Real-time PCR

yöntemiyle doğrulanmış olup sonuçta; miR-1'in, 133a'nın ve 133b'nin downregüle olduğu ve miR-29c'nin upregüle olduğu görülmüştür.

miR-1, 133a ve 133b'nin kardiyak remodeling ve hipertrofide önemli rollerinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu miRNA'ların fizyolojik ve patolojik kardiyak hipertrofi programının bir parçası olarak fonksiyon gösterdikleri kabul edilmektedir (219,222-226). miR-29c'nin upregülasyonu mikroarray yönteminden elde edilen sonuçla paralel olduğu görülmüştür (215). Fernandes ve ark. miR-29'un ekspresyonunun arttığını göstermiştir. miR-29 ailesi, kalpte ve tendonlarda kollajen üretimini ve depolanmasını düzenlemektedir (221-228). miR-29c'nin ekspresyonunun artması, kollajenin ekspresyonunun azalmasıyla ilgilidir. Kemirgenlerde enfarktüs ve kalp yetmezliğinde kollajenlerin düzenlenmesinin miR-29 ailesi tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir (221,226). Daha önce yapılan çalışmalara göre miR-29 ailesinin downregülasyonu ya da inhibisyonunun fibrozisi artırdığı belirtilmektedir (219,222,229). miR-29c'nin hedefi kollajen genidir. miR-29c'nin ekspresyonundaki artmanın kollajen I ve III'ün ekspresyonunda ve hidroksiprolinin konsantrasyonunda azalmaya neden olarak sol ventrikülün kompliyansını ve fonksiyonunu artırdığı belirtilmektedir. miR-29c'nin fizyolojik hipertrofik kalpte kollajen fibrozisini azalttığı kabul edilmektedir. Fizyolojik ve patolojik kardiyak hipertrofinin düzenlenmesi karşılaştırıldığında miR-29'un etkisinin ters olduğu belirtilmektedir (215). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada Melo ve ark. miyokard enfarktüsüne ratlara yüzme egzersizi uygulamış ve kardiyak miR-29a ve miR-29c'nin ekspresyon seviyelerinin korunduğunu göstermişlerdir. miR-29a ve miR-29c'nin ekspresyon seviyelerinin korunması ile kollajen tip I ve III'ün ekspresyonunun önlediğini belirtmişlerdir.

Diğer yandan literatürdeki bir çalışmada bildirildiği üzere bütün kardiyak hastalıklarda yaralanmaya ya da sürekli basınç yüklenmesine cevap olarak kardiyak kollajenin ekspresyonunda artma söz konusudur (222).

Çalışmamızda kullandığımız mikroarray yöntemiyle sıçan genomunda bulunan 25.000 adet gen tarandı. Egzersiz ve kontrol grubu miRNA gen ekspresyonları açısından kıyaslandığında 128 tane miRNA'nın farklı şekilde eksprese olduğu gösterildi. Bunların içinde 128 miRNA'nın 119 tanesi upregüle olurken, 9 tanesi down regüle oldu. Ekspresyonunda değişiklik saptanan 9 tane miRNA geni seçildi ve bu genlerin ekspresyonları RealTime-PCR yöntemiyle doğrulandı. Sonuçta; kalp dokusunda ekspresyonlarında değişiklik saptanan miRNA'ların miR-290 ve miR-194-5p'nin olduğu ve miR-290'ın 6.7 kat downregüle ve miR-194-5p'nin ise 92 kat

upregüle olduğu tespit edildi. Yüzmeyle oluşan fizyolojik kardiyak hipertrofi modelinde bu iki miRNA'nın ekspresyonlarındaki değişiklik bizim tarafımızdan tanımlandı.

Çalışmamızın egzersiz protokolü Fernandes'in çalışmasında kullandığı protokole benzer olup, kollajen gen ekspresyonunu azaltan miR-290 genini tanımladık. Kullandığımız mikroarray yönteminde taranan gen sayısı arttığı için fizyolojik kardiyak hipertrofide rol alan miR-290, miR-194-5p ve miR-132-3p yeni miRNA'lar bu çalışmada tarafımızdan belirlendi.

Çalışmamızda miRNA'ların hedef genlerinin belirlenmesinde çeşitli bilgi bankaları kullanılmıştır (99). miR-290'nın fizyolojik KH'ye neden olan hedef geni Kruppel-like faktör 15 (*Klf15*) olup; miR-290'nın down regüle olması, hedef geni *Klf15*'in upregüle olmasıyla gerçekleşmektedir. *Klf15*, nukleusta bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Klf15 transkripsiyon faktör ailesi çeşitli biyolojik prosesler olan proliferasyon, farklılaşma, büyüme, gelişme ve dışardan uygulanan strese cevapta yer almaktadır (230). *Klf15* taşımayan farelerde fibrozisin geliştiği ve kalpte kollajenin aşırı miktarda depolandığı gösterilmiştir (231). Bu durum bağlayıcı doku büyüme faktörü (CTGF)'nin ekspresyonunun artması kalbin fibrotik hastalıklarının patogenezinde yer aldığını göstermektedir. *Klf15*'in aşırı ekspresyonu bazal ve *TGF-β1*'in neden olduğu CTGF'nin ekspresyonunu baskılamaktadır. Bu çalışmalar *Klf15*'in kardiyak fibrozisi negatif olarak düzenlediğini göstermektedir. *Klf15* geninin upregüle olması kollajenin birikimini önlediği için kalpte fibrozis gelişmeyecektir. *Klf15*, kardiyomiyositlerde kalsinörin-NFAT sinyal yolağının inhibisyonuna neden olarak KH'yi oluşturmaktadır. miR-290'nın hedef geni *Klf15* aracılığıyla kalsinörin-NFAT sinyal yolağında yer aldığı anlaşılmaktadır (99).

miR-290'nın ailesinin fare embriyonik kök hücrelerinde ekspresyonunun yüksek olduğu kök hücrelerinin farklılaşmasında yer aldığı belirtilmektedir (232). miR-290 ailesi, endotelial kök hücrelerde yüksek eksprese olmakta ve fare embriyonik fibroblastlarda yeniden programlanmayı önemli ölçüde artırmaktadır. miR-290'nın hedefi geni olan *Arid4b* aracılığıyla apoptozu artırarak göğüs kanserinin yayılmasını baskıladığı belirtilmektedir (233). miR-290'nın ekspresyonunun artması, immünoglobulin kappa lokusunun B hücresinin gelişiminde aktivasyona neden olduğu belirtilmektedir (234).

miR-194-5p'nin hedef genleri *Hand1* ve *Hand2*'dir. *Hand*, basic Helix-loop helix (bHLH) transkripsiyon faktörlerinin alt sınıfı olup 2 genden (*Hand1* ve *Hand2*) oluşmaktadır. *Hand1* ve *Hand2* genleri balık, kemirgen ve çoğunlukla insanda kalbin normal gelişiminde ve ekstraembriyonik gelişimde yer almaktadır. *Hand1* ve *Hand2* genleri her iki venrikülde eksprese olmaktadır. KH'de *Hand* genlerinin down regüle olması gerektiği Natarajan ve ark. tarafından

2001 yılında gösterilmiştir (235). Başka bir çalışmada da Hand genlerinin down regülasyonunun kardiyak transkripsiyonel program değişikliğinin erken bir indikatörü olup, KH'ye ve daha sonra da kardiyomyopatiye yol açtığı belirtilmektedir (236).

Biz de çalışmamızda miR-194-5p'nin upregüle olmasının bu miRNA'nın hedef genleri olan Hand1 ve Hand2'nin down regüle olmasıyla gerçekleştiğini yapılan biyoinformatik analizler sonucunda gösterdik (Tablo 8). Hand1 ve Hand2 genleri nükleer faktörle aktive olan T hücreleri (NFAT) sinyal yolağında yer almaktadır. NFAT, hipertrofik gen programının aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Hipertrofik uyarıya cevapta, NFAT kalsinörin aracılığıyla defosforile olarak nukleusta yerleşir ve buradaki gen ekspresyonunu aktive eder. Hand1 ve Hand2 genleri aktive olan genlerdendir. Ayrıca Hand2 geni kalp kası hücrelerinin apoptoza gitmesini engellemektedir (Qiagen IPA Analizi). miR-194-5p'deki aktivasyonun hücrelerin apoptoza değil de nekroza yönlendirilmesini sağladığını düşünmekteyiz. Fizyolojik KH'de hücrelerin apoptoza gitmediği bilinmektedir (49). Bu durum da bizim histolojik analiz sonuçlarımızla son derece uyum göstermektedir. Nekrotik kalp dokusunda miR-194-5p'nin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. miR-194-5p'nin ekspresyonunun artmasının inflamasyonda yer alan sitokinlerin üretiminin düzenlenmesini sağladığı gösterilmiştir (237). miR-194-5p'nin ekspresyonunun artması hem hipertrofinin oluşması hem de inflamasyonun zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması için son derece önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, kontrol grubunda kalp kası hücrelerinin normal histolojik özelliklerini koruduğu görüldü (Şekil 19). Bu grupta herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. Egzersiz grubunda ise nekroz, kanama ve intersellüler ödem saptandı (Şekil 20). Hematoksilin – eozin ve Masson trikrom boyama yöntemi ile nekroza giden hücreler gösterildi (Şekil 21,22) . Kanama, ödem ve nekroz bulguları incelenerek yapılan histopatolojik skorlamalarda ortalama histopatolojik skorun egzersiz grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (Şekil 24, p=0,03). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan TUNEL boyama sonucu da uygulanan uzun süreli egzersizin apoptozis yoluyla hücre ölümüne yol açmadığı ve hücrelerin nekroza gittiğini gösterdi (Şekil 25).

miRNA'ların nekrozisi düzenlemesiyle ilgili bilgilerimiz şu anda çok kısıtlı olmakla beraber bu konuda yapılan birkaç çalışma sözkonusudur. Liu J. ve ark. tarafından in vitro kardiyomyosit progenitor hücrelerinde miR-155'in aşırı ekspresyonu gösterilmiştir. Ekspresyon artışı hücre ölümünü özellikle de nekrotik hücre ölümünü azaltmaktadır. miR-155 kardiyomyosit progenitör hücrelerinde RIP1'i baskılayarak anti-nekrotik cevapların oluşmasına neden olmaktadır

(238). Son zamanlarda miyokardiyal nekrozisin patogenezinde yeni görüşler bulunmaktadır. Wang ve ark. kardiyomiyositlerde hidrojen peroksitin neden olduğu nekrotik hücre ölümünde miR-874'ün yüksek oranda upregüle olduğu tanımlamıştır. İn vitro fare miyokard enfarktüsü modelinde miR-874'ün azalmasının kardiyomiyositlerin nekrozunda azalmaya neden olarak kardiyoprotektif etkili olduğu gösterilmiştir. FOXO3A anti-nekrotik transkripsiyon faktörü olup, miR-874'ün ekspresyonunu inhibe edebilmektedir. Bu inhibisyon kaspaz-8'in aktivitesinin artmasına ve nekrozisin azalmasına neden olmaktadır. Kaspaz-8, RIP1 ve RIP3 kinazların parçalanmasına neden olmaktadır (239).

Akut miyokard yetmezliği olan hastalarda miR-194'ün de içinde bulunduğu 3 miRNA'nın serum seviyelerinin arttığı görülmüştür. Bu hastalarda 1 yıl içinde kalp yetmezliğinin oluştuğu gözlenmiştir. miR-194'ün nekrotik kalp dokusundan doğrudan kanamaya salındığı ve yarı ömürlerinin kısa olduğu bildirilmektedir (240). Yapılan diğer bir çalışmada fare karaciğerinde lipopolisakkarit uygulamasıyla inflamasyon modeli oluşturulmuş ve inflamasyonda yer alan sitokinlerin üretimini düzenlenmesinde miRNA'ların rolü araştırılmıştır. miR-194'ün de içinde bulunduğu 12 miRNA'nın ekspresyonunda artma olduğu görülmüştür (237). Farelerde oluşturulan transverse aortik konsriksiyonla (TAC) basınç yüklenmesine bağlı olarak kardiyak hipertrofi modeli oluşturulmuştur. TAC ve kontrol grubunda mikroarray yöntemiyle miRNA'ların analizi yapılmıştır. operasyondan 1, 7 ve 14 gün sonra farelerin kalpleri alınarak Analiz sonucuna göre; miR-290'nın ilk 3 gün downregüle olduğu, 4.-5. ve 6. günlerde upregüle olduğu, 7 ile 8. günlerde downregüle olduğu ve 9. günde ise ekspresyonunda herhangi bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. miR-194'ün ise 1-6. günlerde eksprese olmadığı, 7. günde downregüle olduğu, 8. günde ekspresyonunun olmadığı ve 9. günde ise downregüle olduğu gösterilmiştir (241).

Liu ve ark. rampalı yüzme egzersizi modellerinde fizyolojik kardiyak hipertrofiye neden olan miRNA'ları tanımlamıştır (242). Yüzmeyle 55 tane miRNA farklı şekilde eksprese olmaktadır. miR-222, fizyolojik kardiyak hipertrofide upregüle olan bir genidir. miR-222'nin hedef genleri p27 (hücre siklusu inhibitörü), homeodomain-interacting protein kinaz 1 (protein kinaz) ve homeobox-containing protein 1 (transkripsiyonu baskılayan) genleri olup, kardiyomiyositlerin hipertrofisinde ve proliferasyonunda yer almaktadır. Ekibin yaptığı bir diğer çalışmada, miR-222'nin inhibe edilmesinin yüzmeyle oluşturulan kardiyak hipertrofinin bloklanmasına neden olduğu gösterilmiştir. miR-222'nin aşırı ekspresyonunun iskemik yaralanmaya bağlı oluşan hasardan kalbin korunmasını sağladığı belirtilmektedir.

Fernandes ve ark. (243) normotansif sıçanlarda uyguladıkları yüzme egzersiz modeliyle oluşturdukları KH'de, miR-27a ve miR-27b'nin ekspresyonundaki artmanın hedefi olan anjiotensin-converting enzim (ACE) aracılığıyla gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır. Egzersizle oluşan fizyolojik kardiyak hipertrofide Renin-anjiotensin sisteminin inaktivasyonu, ACE-ANG II seviyesinde azalmaya neden olmaktadır. Fernandes ve ark. sadece 7 gün yapılan egzersizden sonra miR-143'ün ekspresyonunda azalma olduğunu ve 35 gün yapılan egzersizden sonra ise miR-143'ün ekspresyonunda değişiklik olmadığını gözlemlemişlerdir. Diğer taraftan 7 gün yapılan egzersizden sonra miR-27a seviyesinde azalma görülürken, 35 gün yapılan egzersizden sonra miR-27a'nın ekspresyonunda değişiklik olmadığını göstermişlerdir. Böylece yüksek şiddette ve uzun süreli uygulanan egzersizin miR-27a ve miR-143'ün ekspresyonundaki değişiklikleri teşvik ettiğini belirtmektedirler.

Ma ve ark. tarafından (244) yüzme egzersiziyle oluşan kardiyak hipertrofide yer alan miRNA'ların hedefinin PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı olduğu tanımlanmıştır. Egzersizin kardiyak miR-21 ve miR-144'ün ekspresyonunu artırdığını ve hedef genleri olan fosfotaz ve tensin homologda (PI3K/Akt/mTOR yolağının negatif düzenleyicisi) azalmasıyla ilgili olduğunu göstermişlerdir. Yüzme egzersizinden sonra miR-145'deki artmanın tuberous sclerosis kompleks 2'deki azalmayla ilgili olduğu belirtilmektedir (PI3K/Akt/mTOR yolağının diğer negatif düzenleyicisi). Buna karşılık, fizyolojik hipertrofide kardiyak miR-124'ün ekspresyonunun azalmasının, hedef genindeki PI3K (p110- α)'daki artışla ilgili olduğu ifade edilmektedir.

Son zamanlarda Ramasamy ve ark. (245) yüzme egzersizinin oluşturduğu kardiyak hipertrofide bulunan miRNA'ları mikroarray yöntemiyle taramış ve doğrulamasını real-time PCR yöntemiyle yapmışlardır. Çalışmada; miR-30e, miR-133b ve miR-208'in upregüle ve miR-99b ve miR-100'ün de downregüle olduğunu göstermişlerdir. Bu miRNA'lara ait hedef genlerin proliferasyon ve hücre ölümünün düzenlenmesinde yer aldığını ve fizyolojik kardiyak büyümede bulunan PI3K/Akt/mTOR, MAPK ve p53 sinyal yollarıyla bağlantılı olduklarını ortaya koymuşlardır.

Dolaşımda bulunan miRNA'ların ekspresyonlarında görülen farklılıkların uygulanan egzersizin tipine, sıklığına ve süresine bağlı olarak değiştiği yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Dolaşımdaki miR-133a maraton koşusundan ve bir kez yapılan direnç egzersizinden hemen sonra artarken (246), bir kez yapılan bisiklet sürme ya da koşu bandı egzersizinden sonra bu miRlerde herhangi bir değişikliğin olmadığı ifade edilmektedir (246,247).

2014 yılında dolaşımda bulunan miRNA'larla ilgili yapılan bir çalışmada, sağlıklı 21 erkek maratoncuda; dinlenim durumunda, maraton koşusundan hemen sonra ve 24 saat sonra alınan kan örneklerinden iskelet kası (miR-1, miR-133a, miR-499-5p), kalp kası (miR-208a), vasküler endotelyumu (miR-126) ve inflamasyona (miR-146a) özgü olduğu düşünülen aday miRNA'ların analizi yapılmıştır. Maraton koşusundan hemen sonra aday miRNA'larda artma görülürken, koşudan önce alınan örneklerde bu miRNA'ların azaldığı ve koşu tamamlandıktan 24 saat sonra alınan örneklerde ise bu miRNA'ların seviyelerinin koşudan önceki seviyeden daha da düşük olduğu görülmüştür. Buradan yola çıkılarak dolaşımda bulunan miRNA'ların yapılan egzersize farklı yanıt verdiği ifade edilmektedir (240). Maraton koşusundan 24 saat sonra yapılan bir çalışmada dolaşımda bulunan miR-208b ve miR-499 seviyelerinin değişmediği görülmüştür. miR-1, miR-133a ve miR-206 performans parametreleriyle (maksimum oksijen tüketimi ve koşu hızı) ilgili olup, bu miRNA'ların aerobik kapasitenin potansiyel biyomarkerları olduğu belirtilmektedir (248).

2015 yılında yapılan bir çalışmada; akut aerobik egzersizin farklı dozlarına cevap olarak dolaşımda bulunan inflamatuvar miRNA'ların paneli incelenmiştir. Bu çalışmada 9 aktif orta yaşlı erkekten maraton koşusu öncesi ve sonrasında alınan kan örneklerinden dolaşımda bulunan inflamatuvar miRNA'lardan 106 tanesi analiz edilmiştir. Maraton koşusundan sonra inflamasyona neden olan 12 tane inflamatuvar miRNA'nın seviyesinde artmanın olduğu görülmüştür. Miktarı artan miRlerden birisi de miR-132-3p'dir (249).

Yayınlanan bir çalışmada miR-132'nin sinir sisteminde ve kardiyovasküler sistemde fonksiyonunun olduğu belirtilmektedir. Psikik stres BDNF seviyesinin azalmasına neden olmakta ve bağlantılı olarak BDNF'nin azalması CREB'in aktivasyonunda düşmeye yol açarak miR-132'nin downregüle olmasına neden olmaktadır. Bu da nöroplastisitenin bozulmasına ve depresyona neden olmaktadır. Stres ayrıca glikokortikoidlerin artması üzerinden miR-132'nin azalmasına yol açmaktadır. Ayrıca miR-132, otonom sinir sistemi ve hipotalamus-hipofiz-adrenal bez (HPA eksen) aracılığıyla kardiyovasküler fonksiyonu etkilemektedir. Dolaşımda bulunan BDNF'nin çoğu beyinde üretilir ve kan-beyin bariyerini geçerek miR-132'yi de içeren kardiyovasküler fonksiyonu etkileyebileceği ifade edilmektedir. Beyinde üretilen miR-132'nin seviyesinin kardiyovasküler sistemde bulunan seviyesiyle ilgili olduğu belirtilmektedir. Depresyon ve kardiyovasküler hastalıkların tedavi edilmesinde miR-132'nin upregüle olmasının gerektiği vurgulanmaktadır (250).

Yapılan bir diğer çalışmada, beyin inflamasyon modelinde miR-132'nin downregüle olmasının anti-inflamatuar etkili olduğu gösterilmiştir. miR-132'nin hedefi asetilkolinesteraz enzimi olup, miR-132'nin downregüle olması asetilkolin seviyesinin artmasına neden olmaktadır. Asetilkolin miktarının artmasının periferel inflamasyonun inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir (251).

Chlamydial genital enfeksiyon oluşturulan bir fare modelinde, enfeksiyon oluştuktan 24 saat sonra kemokin ve sitokin cevaplarını tanımlamak için inflamasyonla ilgili 134 miRNA'nın ekspresyon profilleri incelenmiştir. miR-132-3p'nin de bulunduğu 12 adet miRNA'nın eksprese olduğu (1.76 kat) ve kemokin/sitokin cevaplarını tersine dönüştürdüğü (downregüle) ifade edilmektedir (252).

Bir başka çalışmada miR-132-3p farklı patolojik koşullar altında, interlökin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)'ün ekspresyonunun downregülasyonuna neden olarak TNF- α 'nın downregüle olmasına ve toll-like reseptör 2 (TLR2)'nin ekspresyonunun düzenlenmesine neden olduğu bildirilmiştir (253). Yapılan diğer bir çalışmada ise, AngII uygulanarak kültüre edilen hücrelerde ve yetişkin kardiyak fibroblastlarında tanımlanan 5 tane miRNA'nın (miR-29b, 129-3p, 132, 132 ve 212) hipertrofi, miyokard enfarktüsü ve fibrozis gibi kardiyovasküler hastalıklarla ilgili olduğu belirtilmektedir. Bu miRNA'lar G α q/11-bağımlı sinyal yolağının aktive olmasını sağlayarak maladaptif hipertrofinin gelişmesine neden olduğu ve bu durumun fibrozise yol açtığı bildirilmiştir. miRNA'ların AngII aracılığıyla G α q/11-bağımlı regülasyonunu büyük oranda Erk1/2-bağımlılığı aracılığıyla gerçekleştirdiği belirtilmektedir (254).

Bizim yaptığımız çalışmada yüzme egzersiziyle oluşturduğumuz kardiyak hipertrofi modelinde dolaşımda bulunan miR-132-3p'nin 16.6 kat upregüle olduğu ilk defa gösterildi (Şekil 18). miRwalk ve miRTarbase kullanılarak deneysel olarak validite edilen miR-132-3p'nin hedefinin MMP9 (Matriks Metalloproteinaz 9) olduğu belirlendi.

Sağlıklı kalpte MMP9'un azalmasıyla kollajen seviyesi normal olur ve kardiyak kök hücrelerinin farklılaşmasına neden olarak kalp sağlıklı olur. MMP-9'un ekspresyonunun artması, kollajen seviyesinin artmasına neden olur. Bu da kardiyak kök hücrelerinin farklılaşmasını inhibe ederek patolojik kardiyak remodeling sürecine yol açar.

Çalışmamızda ortaya konduğu üzere miR-132-3p upregüle olurken, hedef geni MMP-9 downregüle olmaktadır. MMP-9'un downregüle olmasıyla ekstrasellüler matrikste bulunan kollajen miktarı korunarak fibrozisin önüne geçilecektir. miR-132-3p'nin aşırı ekspresyonu Kalsinörin/NFAT pro-hipertrofik yolağı aşırı aktive ederek hipertrofiyi teşvik etmektedir. Ayrıca

anti-hipertrofik transkripsiyon faktörü olan Foxo3a'yı hedefleyerek kardiyak hipertrofiye neden olmaktadır.

Ekspresyonlarında değişiklik saptadığımız miR-290'nın downregüle olurken, miR-132-3p'nin upregüle olmasının kardiyak fibrozisi önleyebileceğini, ayrıca miR-194-5p geninin ekspresyonunda görülen önemli artışın kalbin fizyolojik hipertrofiye yönelmesi sürecinde etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Kanda miR-132-3p'nin miktarında ortaya çıkan artışların ise kardiyak fibrozisi tanımlamada yardımcı olacak bir belirteç olarak kullanılabileceğini öngörmekteyiz.

Bundan sonraki aşamada geleceğe yönelik projeksiyon yapacak olursak; miRNA'ların aktivitelerini belirlemek için fonksiyon kaybı ve kazanımı çalışmalarında kullanılan farklı stratejiler tercih edilebilir. İn-vivo ve in-vitro fonksiyon kaybı çalışmalarında; ilgili genin susturulduğu (genetik knockout) hayvanlar, anti-miR oligonükleotidler, miRNA temizleyicileri ve hedef koruyucular gibi stratejiler kullanılabilir. Fonksiyon kazanımı çalışmaları yapmak için transgenik hayvanlar, sentetik miRNA benzerleri ve miRNA'ların vektöre aktarılarak aşırı eksprese olmasının sağlanması gibi teknolojilerden yararlanılabilir. Bu yöntemlerin seçilmesinde laboratuvar koşullarının uygunluğu belirleyici olacaktır.

Çalışmaların sonuçları olumlu ise bu genlerin düzeyini ayarlayabilecek miRNA-temelli ilaçlar geliştirilebilir. Bu ilaçların geliştirilmesinde ilgili miRNA'ların sadece kalpte eksprese olmaları son derece önem taşımaktadır. Böylece miRNA'nın sadece kendi hedef genleriyle etkileşime girmesi sağlanacaktır. Bu miRNA'lar farklı dokularda eksprese olurlarsa miRNA'ların hedef genlerinin net bir şekilde ortaya konulması gereklidir. Olası hedef genlerin ekspresyonları Real-Time PCR yöntemiyle değerlendirilebilir. Bütün aşamaları olumlu olarak geçiren genlerin sağaltım bekleyen hasta gruplarının yanısıra sporcu gruplarında da incelenmesi gündeme gelebilecektir.

Son olarak çalışmamızda model olarak seçilen aerobik egzersiz programının kalbi fibrozise karşı korumak adına faydalı olabileceği anlaşılmaktadır. Bununla bağlantılı olarak, egzersiz programlarının planlanması sırasında süre ve sıklık gibi özelliklerin patolojik kalp süreçlerinden korunmada dikkat edilmesi gereken önemli unsurlar olduğunu söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. McArdle, W.D., Katch, F.I., Katch, W.L.: Exercise Physiology: Nutrition, Energy, and Human Performance. LWW, Philadelphia, 2015; s:462-497.
2. Wenger, H.A., Bell, G.J.: The interactions of intensity, frequency and duration of exercise training in altering cardiorespiratory fitness. *Sports Med.*, 1986; 3(5):346-56.
3. Zorba, E.: Fiziksel Uygunluk, Başak Oset, Muğla, 2011; s:3-7.
4. Fox, E.I., Brown, R.W., Foss, M.L.: Beden eğitimi ve sporun fizyolojik etkiler. 4. Baskı (Editör: Yaman H), Ankara: Bağiran Yayınevi, 1999.
5. Günay, M., Tamer, K., Cicioğlu, İ.: Spor Fizyolojisi ve performans ölçümü. Ankara: Gazi Kitabevi, 2006.
6. Guyton, A.C., Hall, J.E.: Tıbbi Fizyoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 2007; s: 1057-1060.
7. Bompa, T.O.: Antrenman Kuramı ve Yöntemi, Bağiran Yayınevi, Ankara, 1998; s:36-41.
8. Astrand, P.O., Rodahl, K.: Textbook of Work Physiology Third Edition, McGraw Hill Comp, 1988; 295, 327-330, 556-562.
9. Chatard, J. C., et al.: Performance and drag during drafting swimming in highly trained triathletes. *Med Sci Sports Exerc.*, 1998; 30:1276.
10. Stone, H.L., Liang, I.Y.S.: Cardiovascular response and control during exercise. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1984; 129:13-16.
11. Blomqvist, C.G., Saltin, B.: Cardiovascular adaptations to physical training. *Ann Rev Physiol.*, 1983; 45:169.
12. Brown, S.P., Li, H., Chitwood, L.F., et al.: Blood pressure, hemodynamic and thermal responses after cycling exercise. *J. Appl Physiol.*, 1993; 75:240.
13. Parker, B.M., Londeree, B.R., Cupp, G.V., Dubiel, J.P.: The noninvasive cardiac evaluation of long-distance runners. *Chest.*, 1978; 73:376-381.
14. Paulsen, W., Boughner, D.R., Ko, P., Cunningham, D.A., Persaud, J.A.: Left ventricular function in marathon runners; echocardiographic assessment. *J. Appl Physiol.*, 1981; 51:881-886.
15. Crawford, M.H., Petru, M.A., Rabinowitz, C.: Effect of isotonic exercise training on left ventricular volume during upright exercise. *Circulation.*, 1985; 72:1237-1243.
16. Shepherd, J.T., Blomqvist, C.G., Lind, A.R., et al.: Static (isometric) exercise. *Circ Res.*, 1981; 48: 13-20.
17. Asmussen, E.: Similarities and dissimilarities between static and dynamic exercise. *Cir Res.*, 1981; 48:13-20.
18. Blomqvist, C.G., Lewis, S.F., Taylor, W.F., et al.: Similarity of the hemodynamic responses to static and dynamic exercise of small muscle groups. *Circ Res.*, 1981; 48: 187-192.
19. Hurley, B.F., Seals, D.R., Ehsani, A.A., et al.: Effects of high intensity strength training on cardiovascular function. *Med Sci Sports Exerc.*, 1984; 16:483.

20. Mitchell, J. H., Schibye, B., Payne, F.C., et al.: Response of arterial blood pressure to static exercise in relation to muscle mass, force development and electromyographic activity. *Circ Res.*, 1981; 48: 1170-1175.
21. Clifford, P.S., Hellsten, Y.: Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle. *J. Appl Physiol.*, 2004; 97:393.
22. Buckwalter, J.B., Muller, P.J., Clifford, P.S. Sympathetic vasoconstriction in active skeletal muscle during dynamic exercise. *J. Appl Physiol.*, 1997; 83:1575.
23. Stebbins, C.L., Brown, B., Levin, D., et al.: Reflex effect of skeletal muscle mechanoreceptor stimulation on the cardiovascular system. *J. Appl Physiol.*, 1988; 65:1539.
24. Strange, S., Secher, N.H., Pawelczyk, J.A., et al.: Neural control of cardiovascular responses and ventilation during dynamic exercise in man. *J Physiol.*, 1993; 70:693.
25. McAllister, R.M.: Adaptations in control of blood flow with training: splanchnic and renal blood flows. *Med Sci Sports Exerc.*, 1998; 30:375.
26. Hester, R.L., Choi, J.: Blood flow control during exercise: role for the venular endothelium? *Exerc Sport Sci. Rev.*, 2002;30:147.
27. Richardson, R.S.: Oxygen transport: air to muscle cell. *Med Sci Sports Exerc.*, 1998; 30:53-59.
28. O'Leary, D.S.: Heart rate control during exercise by baroreceptors and skeletal muscle afferents. *Med Sci Sports Exerc.*, 1996; 28:210-217.
29. Thomas, G.D., Segal, S.S.: Neural control of muscle blood flow during exercise. *J. Appl Physiol.*, 2004; 97:731.
30. Williamson, J.W., Nobrega, A.C., Winchester, P.K., et al.: Instantaneous heart rate increase with dynamic exercise: central command and muscle heart reflex contributions. *J. Appl Physiol.*, 1995; 78:1273.
31. Seals, D.R., Taylor, J.A., Ng, A.V., et al.: Exercise and aging: autonomic control of the circulation. *Med Sci Sports Exerc.*, 1994; 26:568.
32. Di Bello, V., Santaro, G., Talarico, L., et al.: Left ventricular function during exercise in athletes and in sedentary men. *Med Sci Sports Exerc.*, 1996; 28:190.
33. Warburton, D.E., Gledhill, N., et al.: Induced hypervolemia, cardiac function, VO₂ max and performance of elite cyclist. *Med Sci Sports Exerc.*, 1999; 31(6):800-8.
34. Goodman, J.M., Liu, P.P., Green, H.J.: Left ventricular adaptations following short-term endurance training. *J. Appl Physiol.*, 2005; 98:454.
35. Raven, P.B., Potts, J.T., Shi, X.: Baroreflex regulation of blood pressure during dynamic exercise. *Exerc Sport Sci.*, 1997; 25:365.
36. Walther, C., Gielen, S., Hambrecht, R.: The effect of exercise training on endothelial function in cardiovascular disease in humans. *Exerc Sport Sci.*, 2004; 32:129.
37. Toner, M.M., Glickman, E.L., McArdle, W.D.: Cardiovascular adjustment to exercise distributed between the upper and lower body. *Med Sci Sports Exerc.*, 1990; 22:773.
38. Miles, D.S., Cox, M.H., Bomze, J.P.: Cardiovascular responses to upper body exercise in normals and cardiac patients. *Med Sci Sports Exerc.*, 1989; 21:126.
39. Holtzhausen, L.M., Noakes, T.D.: The prevalence and significance of post-exercise (postural) hypotension in ultramarathon runners. *Med Sci Sports Exerc.*, 1995; 27:1595-601.

40. Kaufman, F.L., Hughson, R.L., Schaman, J.P.: Effect of exercise on recovery blood pressure in normotensive and hypertensive subjects. *Med Sci Sports Exerc.*, 1987;19:17.
41. Lockwood, J.M., Pricher, M.P., Wilkins, B.W., et al.: Postexercise hypotension is not explained by a prostaglandin-dependent peripheral vasodilation. *J. Appl Physiol.*, 2005; 98:447.
42. Stevenson, E.T., Davy, K.P., Seals, D.R.: Maximal aerobic capacity and total blood volume in highly trained middle-aged and older female endurance athletes. *J. Appl Physiol.*,1994; 77:1691.
43. Krip, B., Gledhill, N., Jamnik, V., et al.: Effect of alterations in blood volume on cardiac function during maximal exercise. *Med Sci Sports Exerc.*,1997; 29:1469.
44. Tate, C.A., Hyek, M.F., Taffet, G.E.: Mechanism for the responses of cardiac muscle to physical activity in old age. *Med Sci Sports Exerc.*,1994;26:561.
45. Carrasco, D.I., Delp, M.D., Ray, C.A.: Effect of concentric and eccentric muscle actions on muscle sympathetic nerve activity. *J. Appl Physiol.*,1999; 86:558.
46. Rogers, M.A., Yamamoto, C., Hagberg, J.M., et al.: The effects of 7 years of intense exercise training on patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.*, 1987; 10:321.
47. Zak, R.: Growth of the heart in health and disease. New York, Raven Press., 1984; 1–24,131–185, 381–420.
48. Cooper, G. T.: Cardiocyte adaptation to chronically altered load. *Annu Rev Physiol.*, 1987; 49:501–518.
49. Bernardo, B.C. et al.: Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies / *Pharmacology & Therapeutics*, 2010; 128: 191–227.
50. Nag, A. C.: Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios.*, 1980; 28(109), 41–61.
51. Soonpaa, M. H., Kim, K. K., Pajak, L., Franklin, M., & Field, L. J.: Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol.*, 1996; 271:2183–2189.
52. Anversa, P., and Nadal-Ginard, B.: Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature.*,2002; 415(6868), 240–243.
53. Estigoy, C. B., Ponten, F., Odeberg, J., Herbert, B., Guilhaus, M., Charleston, M., et al.: Intercalated discs: multiple proteins perform multiple functions in nonfailing and failing human hearts. *Biophys Rev I.*, 2009; 43–49.
54. Knoll, R., Hoshijima, M., Chien, K.: Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease. *J Mol Med.*, 2003; 81(12), 750–756.
55. Hoshijima, M.: Mechanical stress–strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2006; 290(4):1313–1325.
56. Levy, D., Garrison, R. J., Savage, D. D., Kannel, W. B.,Castelli, W. P.: Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.*, 1990; 322(22), 1561–1566.

57. Ferrans, V. J.: Cardiac hypertrophy: morphological aspects. *Growth of the Heart in Health and Disease*, New York: Raven Press, 1984; s:187–239.
58. Fagard, R. H.: Impact of different sports and training on cardiac structure and function. *Cardiol Clin.*, 1997;15(3), 397–412.
59. Grossman, W., Jones, D., McLaurin, L. P.: Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.*,1975; 56(1):56–64.
60. Pluim, B. M., Zwinderman, A. H., van der Laarse, A., van derWall, E. E.: The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation.*, 2000;101(3), 336–344.
61. Berenji, K., Drazner, M. H., Rothermel, B. A., Hill, J. A.: Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2005; 289(1): 8–16.
62. Eghbali, M., Deva, R., Alioua, A., Minosyan, T. Y., Ruan, H., Wang, Y., et al.: Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res.*, 2005;96(11):1208–1216.
63. Aronow, B. J., Toyokawa, T., Canning, A., Haghighi, K., Delling, U., Kranias, E., et al.: Divergent transcriptional responses to independent genetic causes of cardiac hypertrophy. *Physiol Genomics.*,2001; 6(1), 19–28.
64. Scheinowitz, M., Kessler-Icekson, G., Freimann, S., Zimmermann, R., Schaper, W., Golomb, E., et al.: Short- and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression. *Growth Horm IGF Res.*, , 2003;13(1):19–25.
65. Neri Serneri, G. G., Boddi, M., Modesti, P. A., Cecioni, I., Coppo, M., Padeletti, L., et al.: Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circ Res.*,2001b;89(11), 977–982.
66. Schunkert, H., Dzau, V. J., Tang, S. S., Hirsch, A. T., Apstein, C. S., Lorell, B. H.: Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest.*, 1990; 86(6), 1913–1920.
67. Yayama, K., Horii, M., Hiyoshi, H., Takano, M., Okamoto, H., Kagota, S., et al.: Upregulation of angiotensin II type 2 receptor in rat thoracic aorta by pressureoverload. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2004; 308(2), 736–743.
68. Neri Serneri, G. G., Boddi, M., Cecioni, I., Vanni, S., Coppo, M., Papa, M. L., et al.: Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function. *Circ Res.*, 2001a; 88(9):961–968.
69. Bjornerheim, R., Groggaard, H.K., Kjekshus, H. et al.: High Frame Rate Doppler Echocardiography in the rat:” Evaluation of the Method”, *Eu J Echocardiography.*, 2001; 2:78-87.
70. Henschen, S., Skidlauf und Skidwettlauf.: Eline medizinische Sportstudie. *Mitt Med Klin Upsala*, 1899; 2:15.
71. Morganroth, J., Maron, B.J., Henry, W.L., Epstein, S.E.: Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Ann Intern Med.*, 1975; 82:521-524.
72. Mattick, J.S.: RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet.*,2004; 5:316–323.

73. Barrett, L.W., Fletcher, S., Wilton, S.D.: Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2012; 69:3613–3634.
74. Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G., Sementchenko, V., Piccolbon, A., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Ganesh, M., Ghosh, S., Bell, I., Gerhard, D.S., Gingeras, T.R.: Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science*, 2005; 308:1149–1154.
75. Mattick, J.S.: Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep.*, 2001; 2:986–991.
76. Juven-Gershon, T., Hsu, J.Y., Theisen, J.W., Kadonaga, J.T.: The RNA polymerase II core promoter—the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol.*, 2008; 20:253–259.
77. Smale, S.T., Kadonaga, J.T.: The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem.*, 2003; 72:449–479.
78. Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C.A., Taylor, M.S., Engstrom, P.G., Frith, M.C., Forrest, A.R., Alkema, W.B., Tan, S.L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Kitazume, Y., Kawaji, H., Kai, C., Nakamura, M., Konno, H., Nakano, K., Mottagui-Tabar, S., Arner, P., Chesi, A., Gustincich, S., Persichetti, F., Suzuki, H., Grimmond, S.M., Wells, C.A., Orlando, V., Wahlestedt, C., Liu, E.T., Harbers, M., Kawai, J., Bajic, V.B., Hume, D.A., Hayashizaki, Y.: Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet.*, 2006; 38:626–635.
79. Banerjee, A.K.: 50-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev.*, 1980; 44:175–205.
80. Jackson, R.J., Hellen, C.U., Pestova, T.V.: The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2010; 11:113–127.
81. Meijer, H.A., Thomas, A.A.: Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 50-untranslated region of an mRNA. *Biochem J.*, 2002; 367:1–11.
82. Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., Pesole, G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol 3 REVIEWS0004*, 2002.
83. Morris, D.R., Geballe, A.P.: Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol.*, 2000; 20:8635–8642.
84. Wethmar, K., Smink, J.J., Leutz, A.: Upstream open reading frames: molecular switches in (patho)physiology. *Bioessays.*, 2010; 32:885–893.
85. Calvo, S.E., Pagliarini, D.J., Mootha, V.K.: Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc Natl Acad Sci.*, 2009; 106:7507–7512.
86. Nolis, I.K., McKay, D.J., Mantouvalou, E., Lomvardas, S., Merika, M., Thanos, D.: Transcription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions. *Proc Natl Acad Sci.*, 2009; 106:20222–20227.
87. Ong, C.T., Corces, V.G.: Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nat Rev Genet.*, 2011; 12:283–293.
88. Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J.S., Hinrichs, A.S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L.W., Richards, S., Weinstock, G.M., Wilson, R.K., Gibbs,

- R.A., Kent, W.J., Miller, W., Haussler, D.: Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.*, 2005; 15:1034–1050.
89. Gorgoni, B., Gray, N.K.: The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct Genomic Proteomic.*, 2004; 3:125–141.
 90. Mangus, D.A., Evans, M.C., Jacobson, A.: Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.*, 2003; 4:223.
 91. Cao, Q., Richter, J.D.: Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *EMBO J.*, 2002;21:3852–3862.
 92. Kuhn, U., Gundel, M., Knoth, A., Kerwitz, Y., Rudel, S., Wahle, E.: Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *J Biol Chem.*, 2009;284:22803–22814.
 93. Bartel, D.P.: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.*, 2004;116:281-97.
 94. Reinhart, B.J. et al.: The 21 nucleotide let-7a RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000; 403, 901-906.
 95. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993; 75, 843-854.
 96. Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G.: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993; 75, 855-862.
 97. Pasquinelli, A.E., et al.: Conservation across animal phylogeny of the sequence and temporal regulation of the 21 nucleotide let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 2000; 408, 86-89.
 98. Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P.: An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001; 294, 858-862.
 99. <http://www.miRBase.org>, www.ingenuity.com, miRWalk: A database on predicted and published MicroRNAs.
 100. Kozomara, A., Griffiths-Jones, S.: miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 2011;39:152-7.
 101. Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P.: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005;120:15-20.
 102. Lai, E.C.: Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet.*, 2002;30:363-4.
 103. Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., et al.: Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003;115:787-98.
 104. Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., et al.: Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, 2005;122:553-63.

105. Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L.: RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.*, 2006;13:1097-101.
106. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., et al.: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003;425:415-9.
107. Mishra, P.K., Tyagi, N., Kumar. M., et al.: MicroRNAs as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *J Cell Mol Med.*, 2009;13:778-89.
108. Zhang, C.: MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clin Sci.*, 2008;114:699-706.
109. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., et al.: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 2003;115:199-208.
110. van Rooij, E., Olson, E.N.: MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest.*, 2007;117:2369-76.
111. Ruby, J.G., Jan, C.H., Bartel, D.P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 2007;448:83-6.
112. Orenes-Piñero, E., Montoro-García, S., Patel, J.V., Valdés, M., Marín, F., Lip, G.Y.: Role of microRNAs in cardiac remodelling: New insights and future perspectives. *International Journal of Cardiology*, 2013;167:1651–1659.
113. Fiedler, J., Gupta, S.K., Thum, T.: Identification of cardiovascular microRNA targetomes. *J Mol Cell Cardiol.*, 2011.
114. Zampetaki, A., Kiechl, S., Drozdov, I., Willeit, P., Mayr, U., Prokopi, M., et al.: Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res.*, 2010;107:810–7.
115. Gladka, M.M., da Costa Martins, P.A., De Windt, L.J.: Small changes can make a big difference- MicroRNA regulation of cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012; 52:74–82.
116. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T.: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.*, 2002; 12, 735–739.
117. Ruby, J.G., Jan, C.H., Bartel, D.P.: Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 2007;448:83-6.
118. Ji, R., Cheng, Y., Yue, J. et al.: MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ. Res.* 2007; 100, 1579–1588.
119. Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M.: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci.*, 2008;105:10513–10518.
120. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Zen, K., Zhang, C.Y.: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;18:997–1006.

121. Creemers, E. E., Tijssen A.J., Pinto, Y.M.: Circulating MicroRNAs Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? *Circ Res.* 2012;110:481–482.
122. Fichtlscherer, S., Zeiher, A.M., Dimmeler, S.: Circulating MicroRNAs: Biomarkers or Mediators of Cardiovascular Diseases? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:2383-2390.
123. Srivastava, D.: Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 2006; 126:1037–48.
124. Buckingham, M., Meilhac, S., Zaffran, S.: Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet.*, 2005;6:826–35.
125. Kirby, M.L., Waldo, K.L.: Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res.*, 1995;77:211–5.
126. Chen, J.F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., et al.: The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.*, 2006;38:228–33.
127. Creemers, E.E.,Tijssen, A.J., Pinto, Y.M.: Circulating MicroRNAs Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? *Circ Res.* 2012;110:481–482.
128. Srivastava, D., Thomas, T., Lin, Q., Kirby, M.L., Brown, D., Olson, E.N.: Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet.*, 1997;16:154–60.
129. Liu, N., Bezprozvannaya, S., Williams, A.H., Qi, X., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., et al.: microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smoothmuscle gene expression in the heart. *Genes Dev.*, 2008; 22:3242–54.
130. Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., et al.: MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.*, 2007;13:613–8.
131. Castaldi, A., Zaglia, T., Di Mauro, V., Carullo, P., Viggiani, G., Borile, G., et al.: MicroRNA-133 modulates the beta1-adrenergic receptor transduction cascade. *Circ Res.*, 2014;115: 273–83.
132. van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B.A., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., et al.: A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell.*, 2009;17:662–73.
133. van Rooij, E., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J., Olson, E.N.: Control of stressdependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 2007;316: 575–9.
134. Montgomery, R.L., Hullinger, T.G., Semus, H.M., Dickinson, B.A., Seto, A.G., Lynch, J.M., et al.: Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation*, 2011;124:1537–47.
135. Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., et al.: Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of themiR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, 2008;132:875–86.
136. Wang, J., Greene, S.B., Bonilla-Claudio, M., Tao, Y., Zhang, J., Bai, Y., et al.: Bmp signaling regulates myocardial differentiation from cardiac progenitors through a MicroRNAmmediated mechanism. *Dev Cell.*, 2010;19:903–12.

137. Chen, J., Huang, Z.P., Seok, H.Y., Ding, J., Kataoka, M., Zhang, Z., et al.: miR-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ Res.*, 2013;112:1557–66.
138. Porrello, E.R., Johnson, B.A., Aurora, A.B., Simpson, E., Nam, Y.J., Matkovich, S.J., et al.: MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res* 2011;109: 670–9.
139. Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Johnson, B.A., Grinsfelder, D., Canseco, D., et al.: Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc Natl Acad Sci.*, 2013;110:187–92.
140. Philippen, L.E., Dirkx, E., da Costa-Martins, P.A., DeWindt, L.J.: Non-coding RNA in control of gene regulatory programs in cardiac development and disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2015; xxx:xxx–xxx.
141. Lichan, Tao., Yihua, Bei., Yanli, Zhou., Junjie, Xiao., Xinli, Li.: Non-coding RNAs in cardiac regeneration. *Oncotarget*, 2015; 6:40.
142. Batista, P.J., Chang, H.Y.: Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell*, 2013;152:1298-307.
143. Mercer, T.R., Mattick, J.S.: Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat Struct Mol Biol.*, 2013;20:300-7.
144. Ounzain, S., Crippa, S., Pedrazzini, T.: Small and long non-coding RNAs in cardiac homeostasis and regeneration. *Biochim Biophys Acta.*, 2013;1833:923-33.
145. Chen, J., Huang, Z.P., Seok, H.Y., Ding, J., Kataoka, M., Zhang, Z., Hu, X., Wang, G., Lin, Z., Wang, S., Pu, W.T., Liao, R., Wang, D.Z.: mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ Res.*, 2013;112:1557-66.
146. Tian, Y., Liu, Y., Wang, T., Zhou, N., Kong, J., Chen, L., Snitow, M., Morley, M., Li, D., Petrenko, N., Zhou, S., Lu, M., Gao, E., Koch, W.J., Stewart, K.M., Morrisey, E.E.: A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice. *Sci Transl Med.*, 2015;7:279ra38.
147. Porrello, E.R., Johnson, B.A., Aurora, A.B., Simpson, E., Nam, Y.J., Matkovich, S.J., Dorn, G.W., 2nd, van Rooij, E., Olson, E.N.: MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res.*, 2011;109:670-9.
148. Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Johnson, B.A., Grinsfelder, D., Canseco, D., Mammen, P.P., Rothermel, B.A., Olson, E.N., Sadek, H.A.: Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc Natl Acad Sci.*, 2013;110:187-92.
149. Hullinger, T.G., Montgomery, R.L., Seto, A.G., Dickinson, B.A., Semus, H.M., Lynch, J.M., Dalby, C.M., Robinson, K., Stack, C., Latimer, P.A., Hare, J.M., Olson, E.N., van Rooij, E.: Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ Res.*, 2012; 110:71-81.
150. Zhao, Y., Ransom, J.F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A.N., Tsuchihashi, T., McManus, M.T., Schwartz, R.J., Srivastava, D.: Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 2007;129:303-17.

151. Zhao, Y., Samal, E., Srivastava, D.: Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 2005;436:214-20.
152. Sluijter, J.P., van Mil, A., van Vliet, P., Metz, C.H., Liu, J., Doevendans, P.A., Goumans, M.J.: MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2010;30:859-68.
153. Yin, V.P., Lepilina, A., Smith, A., Poss, K.D.: Regulation of zebrafish heart regeneration by miR-133. *Dev Biol.*, 2012;365:319-27.
154. Small, E.M., Frost, R.J., Olson, E.N.: MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation.*, 2010;121:1022-32.
155. Ivey, K.N., Muth, A., Arnold, J., King, F.W., Yeh, R.F., Fish, J.E., Hsiao, E.C., Schwartz, R.J., Conklin, B.R., Bernstein, H.S., Srivastava, D.: MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell stem cell.*, 2008;2:219-29.
156. Wilson, K.D., Hu, S., Venkatasubrahmanyam, S., Fu, J.D., Sun, N., Abilez, O.J., Baugh, J.J., Jia, F., Ghosh, Z., Li, R.A., Butte, A.J., Wu, J.C.: Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: role for miR-499. *Circ Cardiovasc Genet.*, 2010;3:426-35.
157. Glass, C., Singla, D.K.: MicroRNA-1 transfected embryonic stem cells enhance cardiac myocyte differentiation and inhibit apoptosis by modulating the PTEN/Akt pathway in the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2011;301:H2038-49.
158. Chen, J.F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., Wang, D.Z.: The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.*, 2006;38:228-33.
159. Yin, Y., Wang, H., Liu, K., Wang, F., Ye, X., Liu, M., Xiang, R., Liu, N., Liu, L.: Knockdown of H19 enhances differentiation capacity to epidermis of parthenogenetic embryonic stem cells. *Curr Mol Med.*, 2014;14:737-48.
160. Whelan, R.S., Kaplinskiy, V., Kitsis, R.N.: Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol.*, 2010;72:19-44.
161. Hengartner, M.O.: The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000;407(6805):770-6.
162. Crow, M.T., Mani, K., Nam, Y.J., Kitsis, R.N.: The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res.*, 2004;95(10):957-70.
163. Gustafsson, A.B., Gottlieb, R.A.: Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2007;292(1):C45-51.
164. Gao, C.F., Ren, S., Zhang, L., Nakajima, T., Ichinose, S., Hara, T., et al. Caspase-dependent cytosolic release of cytochrome c and membrane translocation of Bax in p53-induced apoptosis. *Exp Cell Res.*, 2001;265(1):145-51.
165. Teiger, E., Than, V.D., Richard, L., Wisnewsky, C., Tea, B.S., Gaboury, L., et al.: Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest.*, 1996; 97(12):2891-7.
166. Pimentel, D.R., Amin, J.K., Xiao, L., Miller, T., Viereck, J., Oliver-Krasinski, J., et al.: Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ Res.*, 2001;89(5):453-60.

167. Chen, X., Gong, J., Zeng, H., Chen, N., Huang, R., Huang, Y., et al.: MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression. *Cancer Res.*, 2010;70(7):2728–38.
168. Lin, Y., Liu, X., Cheng, Y., Yang, J., Huo, Y., Zhang, C.: Involvement of microRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.*, 2009;284(12):7903–13.
169. Ng, I.H., Yeap, Y.Y., Ong, L.S., Jans, D.A., Bogoyevitch, M.A.: Oxidative stress impairs multiple regulatory events to drive persistent cytokine-stimulated STAT3 phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.*, 2014;1843(3):483–94.
170. Xu, C., Hu, Y., Hou, L., Ju, J., Li, X., Du, N., et al.: beta-Blocker carvedilol protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis by up-regulating miR-133 expression. *J Mol Cell Cardiol.*, 2014;75:111–21.
171. Zhu, H., Fan, G.C.: Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling. *Cardiovasc Res.*, 2012;94(2):284–92.
172. Choi, A.M., Ryter, S.W., Levine, B.: Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 2013;368(7):651–62.
173. Nishida, K., Yamaguchi, O., Otsu, K.: Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res.*, 2008;103(4):343–51.
174. Chiong, M., Wang, Z.V., Pedrozo, Z., Cao, D.J., Troncoso, R., Ibacache, M., et al.: Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis Dec.*, 2011; 22(2): e244.
175. Whelan, R.S., Kaplinskiy, V., Kitsis, R.N.: Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol.*, 2010;72:19–44.
176. Christofferson, D.E., Yuan, J.: Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol.*, 2010;22(2):263–8.
177. Li, J., McQuade, T., Siemer, A.B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.S., et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell*, 2012;150(2):339–50.
178. Baines, C.P.: The cardiac mitochondrion: nexus of stress. *Annu Rev Physiol.*, 2010;72: 61–80.
179. Vaseva, A.V., Marchenko, N.D., Ji, K., Tsirka, S.E., Holzmann, S., Moll, U.M.: P53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 2012; 149(7):1536–48.
180. Li, Q., Xie, J., Li, R., Shi, J., Sun, J., Gu, R., et al. Overexpression of microRNA-99a attenuates heart remodelling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *J Cell Mol Med.*, 2014;18(5):919–28.
181. Pan, W., Zhong, Y., Cheng, C., Liu, B., Wang, L., Li, A., et al. MiR-30-regulated autophagy mediates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy. *PLoS One* 2013;8(1): e53950
182. Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., McCabe, V.M., Norris, D.P., Cooper, P.J., et al. The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell*, 1992;71(3):515–26.

183. Brown, C.J., Hendrich, B.D., Rupert, J.L., Lafreniere, R.G., Xing, Y., Lawrence, J., et al. The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*, 1992;71(3):527–42.
184. Papait, R., Kunderfranco, P., Stirparo, G.G., Latronico, M.V., Condorelli, G.: Long noncoding RNA: a new player of heart failure? *J Cardiovasc Transl Res.* 2013;6(6):876–83.
185. Wang, K.C., Chang, H.Y.: Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell.*, 2011;43(6):904–14.
186. Maass, P.G., Luft, F.C., Bähring, S.: Long non-coding RNA in health and disease. *J Mol Med.*, 2014;92(4):337–46.
187. Kemi, O.J., Ceci, M., Wisloff, U., Grimaldi, S., Gallo, P., Smith, G.L., et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J. Cell. Physiol.*, 2008; 214: 316–321.
188. Ramasamy, S., Velmurugan, G., Rajan, K.S., Ramprasath, T., Kalpana, K.: MicroRNAs with Apoptosis Regulating Potential Are Differentially Expressed in Chronic Exercise-Induced Physiological Hypertrophied Heart. *PLOS One*, DOI:10.1371/journal.pone.0121401 2015
189. Song, D.W., Ryu, J.Y., Kim, J.O., Kwon, E.J., Kim do, H.: The miR-19a/b family positively regulates cardiomyocyte hypertrophy by targeting atrogin-1 and MuRF-1. *Biochem.*, 2014; 457: 151–162.
190. Pan, W., Zhong, Y., Cheng, C., Liu, B., Wang, L., Li, A., et al. miR-30-Regulated Autophagy Mediates Angiotensin II-Induced Myocardial Hypertrophy. *PLoS One.* 2013; 8: e53950.
191. Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* 2007; 13: 613–618.
192. Montgomery, R.L., Hullinger, T.G., Semus, H.M., Dickinson, B.A., Seto, A.G., Lynch, J.M., et al. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation.* 2011; 124:1537–1547.
193. Coppola, A., Romito, A., Borel, C., Gehrig, C., Gagnebin, M., Falconnet, E. et al. Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications. *Stem Cell Res.* 2014; 12: 323–337.
194. Sucharov, C., Bristow, M.R., Port, J.D.: miRNA expression in the failing human heart: Functional Correlates. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2008; 45: 185–192.
195. Huang, Z.P., Chen, J., Seok, H.Y., Zhang, Z., Katoaka, M., Hu, X., et al. MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circulation Res.* 2013; 112: 1234–1243.
196. Sun, X., Icli, B., Wara, A.K., Belkin, N., He, S., Kobzik, L., et al. MicroRNA181-b regulates NF- κ B mediated vascular inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2012; 122: 1973–1990.
197. Edwards, J.G.: Swimming training increases ventricular atrial natriuretic factor (ANF) gene expression as an early adaptation to chronic exercise. *Life Sci.*, 2002; 70:2753-2768.
198. Evangelista, F.S., Brum, P.C., Krieger, J.E.: Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz J Med Biol Res.*, 2003; 36:1751-1759.

199. Harri, M., Kuusela, P.: Is swimming exercise or cold exposure for rats? *Acta Physiol Scand.*, 1986; 126:189-197.
200. Lemitsu, M., Miyauchi, T., Maeda, S., Sakai, S., Fujii, N., Miyazaki, H., Kakimura, Y., Matsuda, M., Yamaguchi, I.: Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertens Res.* 2003;26:829-837.
201. Bilban, M., Buehler, L.K., Head, S., Desoye, G., & Quaranta, V. Normalizing DNA Microarray Data. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2002; 4:57-64.
202. Russo, G., Zegar, C., & Giordano, A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene*, 2003; 22: 6497–6507.
203. Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Norton, H., & Brown, E.L. DNA expression monitoring by hybridization of high density oligo-nucleotide arrays. *Nature Biotechnology*, 1996;14:1675–1680.
204. Schena, M., Shalon, D., Davis, R., & Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995; Vol.270, s:467-470.
205. Lipshutz, R.J., Fodor, S.P.A., Gingeras, T.R., & Lockhart, D.J.: High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature genetics supplement*, 1999;Vol.21, s:20-24.
206. Tarca, A.L., Romero, R., & Draghici, S. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2006; Vol.195, s: 373–388.
207. Schadt, E.E., Li, C., Su, C., & Wong, W.H. Analyzing High-Density Oligonucleotide Gene Expression Array Data. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2001; Vol.80, pp. 192–202.
208. Nambiar, P.R., Boutin, S.R., Raja, R., Rosenberg, W.: Global Gene Expression Profiling: A Complement to Conventional Histopathologic Analysis of Neoplasia. *Vet Pathol* 2005; 42:735-752.
209. **Rickert, A.M., Lehrach, H., Sperling, S.:** Multiplexed Real-Time PCR Using Universal Reporters . *Clinical Chemistry*, 2004; 50:1680-1683.
210. Breljak, D. *et al.*: Relative Quantification of mRNA, *Food Technol. Biotechnol.* 2005;43 (4) 379–388.
211. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M.: Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996, 6(10):986-94.
212. Soci, U.P., Fernandes, T., Hashimoto, N.Y., Mota, G.F., Amadeu, M.A., Rosa, K.T., et al. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiological genomics.*, 2011;43(11):665-73.
213. Quiñones, M.A., Otto, C.M., Stoddard, M., Waggoner, A., Zoghbi, W.A.: Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: a report from the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. 2002 Feb;15(2):167-84.

214. de Simone, G., Wallerson, D.C., Volpe M, Devereux, R.B.: Echocardiographic measurement of left ventricular mass and volume in normotensive and hypertensive rats. Necropsy validation. *Am J Hypertens.*, 1990; 3(9):688-96.
215. Livak, K.J., Schmittgen, T.D.: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method, *METHODS*, 2001; 402-408.
216. Maron, B.J.: Structural Features of the Athlete Heart as Defined by Echocardiography. *JACC.*, 1986;7(1):190-203.
217. Rerych, S.K., Scholz, P.M., Sabiston, D.C., Jones, R.H. Effects of exercise training on left ventricular function in normal subjects a longitudinal study by radionuclide angiography. *Am J Cardiol.*, 1980; 45:244-52.
218. Stein, R.A., Michielli, D., Diamond, J., Horwitz, B., Krasnow, N.: The cardiac response to exercise training: echocardiographic analysis at rest and during exercise. *Am J Cardiol.*, 1980; 46:219-25.
219. Carè, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., Elia, L., Latronico, M.V., Høydal, M., Autore, C., Russo, M.A., Dorn, G.W., 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.*, 2007; 13: 613–618.
220. Takaya, T., Ono, K., Kawamura, T., Takanabe, R., Kaichi, S., Morimoto, T., Wada, H., Kita, T., Shimatsu, A., Hasegawa, K.: MicroRNA-1 and MicroRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells. *Circ J*, 2009; 73: 1492–1497.
221. van Rooij, E., Sutherland, L.B., Thatcher, J.E., DiMaio, J.M., Naseem, R.H., Marshall, W.S., Hill, J.A., Olson, E.N.: Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2008; 105: 13027–13032.
222. van Rooij, E., Marshall, W.S., Olson, E.N.: Toward microRNA-based therapeutics for heart disease. *Circ Res.*, 2008;103: 919–928.
223. Catalucci, D., Gallo, P., Condorelli, G.: MicroRNAs in cardiovascular biology and heart disease. *Circ Cardiovasc Genet.*, 2009; 2: 402–408.
224. Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol.*, 2009; 6: 419–429.
225. van Rooij, E., Olson, E.N.: MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 2007;117: 2369–2376.
226. van Rooij, E., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J., Olson, E.N.: Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 2007; 316: 575–579.
227. Chen CH, Zhou YL, Wu YF, Cao Y, Gao JS, Tang JB. Effectiveness of microRNA in Down-regulation of TGF-beta gene expression in digital flexor tendons of chickens: in vitro and in vivo study. *J Hand Surg Am.*, 2009;34: 1777–1784.
228. Maurer, B., Stanczyk, J., Jüngel, A., Akhmetshina, A., Trenkmann, M., Brock, M., Kowal-Bielecka, O., Gay, R.E., Michel, B.A., Distler, J.H., Gay, S., Distler, O.:

- MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.*, 2010; 62: 1733–1743.
229. Liu, N., Bezprozvannaya, S., Williams, A.H., Qi, X., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N.: MicroRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 2008; 22: 3242–3254.
230. McConnell, B.B., Yang, V.W.: Mammalian Krüppel-Like Factors in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2010; 90(4): 1337-1381.
231. Wang, B., Haldar, S.M., Lu, Y., Ibrahim, O.A., Fisch, S., Gray, S., Leask, A., Jain, M.K.: The Kruppel-like factor KLF15 inhibits connective tissue growth factor (CTGF) expression in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.*, 2008; 45: 193-197.
232. Kuppasamy, K.T., Sperber, H., Baker, H.R.: MicroRNA Regulation and Role in Stem Cell Maintenance, Cardiac Differentiation and Hypertrophy. *Curr Mol Med.*, 2013;13(5):757-764.
233. Goldberger, N., Walker, R.C., Kim, C.H., Winter, S., Hunter, K.W.: Inherited variation in miR-290 expression suppresses breast cancer progression by targeting the metastasis susceptibility gene *Arid4b*. *Cancer Res.* 2013;73(8):2671-2681.
234. Garcia, P.B. et al. miR290-5p/292-5p Activate the Immunoglobulin kappa Locus in BCellDevelopment. *PLoSOne*, 2012; 7(8):e43805. doi:10.1371/journal.pone.0043805.
235. Natarajan, A., Yamagishi, H., Ahmad, F., Li, D., Roberts, R., Matsuoka, R., Hill, S., Srivastava, D.J.: Human eHAND, but not dHAND, is down-regulated in cardiomyopathies. *Mol. Cell. Cardiol.* 2001;33:1607–1614.
236. Thattaliyath, B.D., Livi, C.B., Steinhilber, M.E., Toney, G.M., Firulli, A.B.: HAND1 and HAND2 are expressed in the adult-rodent heart and are modulated during cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002; 297:870–875.
237. Moschos, S.A. et al. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics*, 2007, 8.240
238. Liu, J., et al. MicroRNA-155 prevents necrotic cell death in human cardiomyocyte progenitor cells via targeting RIP1. *J Cell Mol Med Jul.*, 2011;15(7): 1474-82.
239. Wang, K., et al. miR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. *Cell Death Dis.*, 2013; 4:e709.
240. Baggish, A.L. et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *J Appl Physiol.*, 2014; 116:522-531.
241. Sayed, D., Hong, C., Chen, I.Y., Lypowy, J., Abdellatif, M.: MicroRNAs Play an Essential Role in the Development of Cardiac Hypertrophy. *Circ Res.* 2007;100:416-424.
242. Liu, X., Xiao, J., Zhu, H., Wei, X., Platt, C., Damilano, F., Xiano, C., Bezzerides, V., Boström, P., Che, L., Zhang, C., Spiegelman, B.M., Rosenzweig, A.: miR-222 is necessary for exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell Metab.*, 2015; 21: 584-595.
243. Fernandes, T., Hashimoto, N.Y., Magalhaes, F.C., Fernandes, F.B., Casarini, D.E., Carmona, A.K., Krieger, J.E., Phillips, M.I., Oliveira, E.M.: Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased

- angiotensin-converting enzyme-angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*, 2011; 58: 182-189.
244. Ma, Z., Qi, J., Meng, S., Wen, B., Zhang, J.: Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Eur J Appl Physiol.*, 2013;113:2473-2486.
245. Ramasamy, S., Velmurugan, G., Shanmugha, R.K., Ramprasath, T., Kalpana, K.: MiRNAs with apoptosis regulating potential are differentially expressed in chronic exercise-induced physiologically hypertrophied hearts. *PLoS One*, 2015; 10:e0121401.
246. Uhlemann, M., Möbius-Winkler, S., Fikenzler, S., Adam, J., Redlich, M., Möhlenkamp, S., et al. Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults. *Eur.J.Prev.Cardiol.*, 2014; 21(4):484-91.
247. Baggish, A. L., Hale, A., Weiner, R.B., Lewis, G.D., Systrom, D., Wang, F., et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J. Physiol.* 2011;589, 3983–3994.
248. Mooren, F.C., Viereck, J., Kruger, K., Thum, T.: Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;306:H557-H563.
249. de Gonzalo-Calvo D, et al. Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise. *American Physiology Society*, 2015; 119:124-134.
250. Zheng, Z., Zeng, Y., Huang, H., Xu, F.: MicroRNA-132 may play a role in coexistence of depression and cardiovascular disease: A hypothesis: *Med Sci Monit.*, 2013;19: 438-443, 2013.
251. O'Neill, L.A.: Boosting the brain's ability to block inflammation via microRNA-132. *Immunity*, 2009;31:854-855.
252. Yeruva, L. et al. Early MicroRNA Expression Profile as a Prognostic Biomarker for the Development of Pelvic Inflammatory Disease in a Mouse Model of Chlamydial Genital Infection. *MBio.*, 2014; 5(3):e01241-14. doi.10.1128/mBio.01241-14
253. Nahid, M.A. et al. Regulation of TLR2-mediated tolerance and cross-tolerance through IRAK4 modulation by miR-132 and miR-212. *J Immunol.*, 2013;190(3):1250-1263.
254. Jeppesen, P.L. et al. Angiotensin II type 1 receptor signaling regulates microRNA differentially in cardiac fibroblasts and myocytes. *British Journal of Pharmacology*, 2011; 164, 394-404.

ETİK KURUL KARARI





T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2024/259
KONU: Sn. Prof. Dr. Gökhan METİN

05.10.2024

Sayın, Prof. Dr. Gökhan METİN

Dağıtım "Düzensiz Alkolik Enzimsal Oluşumlar Kimyevik Hücrelerin MicroRNA ile Baskısı" adlı projenin 02.10.2024 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onaylanmıştır.

Yrd. Doç. Dr. Fahri AKRAY
Etik Kurul. Başkanı Yek.

Prof. Dr. Ahmet BİÇER
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. Sami MİRAL
Üye

Prof. Dr. Mustafa C. MEZ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ümmü ÖYSAL
Üye

Vel. Fak. Men. ÇELİKTEKİN
Üye

Nasuh GÜNAY
Üye

Vel. ÖZTÜRK
Üye

- Etik kurulumuzda önce adı ile proje, çalışma başlamadan 3 ay önce gerçekleştirilen hayvan deneyinin uygulanması (milyarlar) belirlenmiş ve a. Döner Hayvanat. Laboratuvarına beyan edilmiştir.